

Alma Mater Studiorum – Università di Bologna

**DOTTORATO DI RICERCA**  
**Biologia e Fisiologia Cellulare**

Ciclo XX

Settore scientifico disciplinare di afferenza: BIO/01

**EFFETTI DEL CHITOSANO SU COMPOSTI  
POLIFENOLICI IN COLTURE CELLULARI DI VITE:  
ASPETTI MOLECOLARI E METABOLICI**

*Dott.ssa Maura Ferri*

**Coordinatore Dottorato**

*Prof.ssa Michela Rugolo*

**Relatore**

*Prof. Nello Bagni*

Aprile 2008



# **INDICE**

## **ABSTRACT**

Abstract (in inglese) .....	pag. 7
-----------------------------	--------

## **INTRODUZIONE**

1. Coltura <i>in vitro</i> di cellule e tessuti vegetali .....	pag. 11
1.1 Colture di cellule vegetali in scala di laboratorio .....	pag. 11
1.2 Colture di cellule vegetali in grande scala .....	pag. 13
1.3 Colture di cellule di vite .....	pag. 14
2. Sistemi di difesa delle piante .....	pag. 16
2.1 Fitoalessine .....	pag. 16
2.2 Proteine PR (pathogenesis-related) .....	pag. 18
3. Stilbeni .....	pag. 21
3.1 Resveratrolo .....	pag. 23
3.2 Biosintesi e reattività chimica .....	pag. 26
3.3 Stilbeni monoglucosilati .....	pag. 29
3.4 Stilbene sintasi e calcone sintasi .....	pag. 31
4. Altri polifenoli vegetali .....	pag. 33
4.1 Flavonoidi .....	pag. 35
4.2 Catechine .....	pag. 38
4.3 Antociani .....	pag. 39
4.4 Tannini .....	pag. 40
4.5 Acidi idrossicinnamici .....	pag. 42
5. Chitosano .....	pag. 43

## **SCOPO DELLA TESI**

Scopo della tesi .....	pag. 45
------------------------	---------

## **MATERIALI E METODI**

1. Colture cellulari .....	pag. 47
1.1 Sterilizzazione degli espianti ed induzione di callo .....	pag. 47
1.2. Sospensioni cellulari .....	pag. 48

1.3 Colture in bioreattore .....	pag. 50
2. Elicitazione .....	pag. 51
2.1 Preparazione della soluzione di chitosano .....	pag. 51
2.2 Trattamento delle colture .....	pag. 51
3. Analisi delle caratteristiche delle colture cellulari in time-course .....	pag. 52
3.1 Conteggio del numero di cellule .....	pag. 52
3.2 Saggio della vitalità cellulare .....	pag. 53
3.3 Misurazione del pH della coltura .....	pag. 53
3.4 Misurazione del peso cellulare e calcolo del TMD .....	pag. 53
3.5 Controllo della presenza di H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	pag. 54
3.6 Quantificazione di saccarosio e glucosio .....	pag. 54
4. Determinazione del contenuto di resveratrolo e altri stilbeni e flavonoidi mediante HPLC .....	pag. 56
4.1 Estrazione di stilbeni dal terreno di coltura (metodo 1) .....	pag. 67
4.2 Estrazione di stilbeni da cellule (metodo 1) .....	pag. 57
4.3 Preparazione dei campioni (metodo 1) .....	pag. 58
4.4 Analisi cromatografica (metodo 1) .....	pag. 58
4.5 Determinazione del contenuto di resveratrolo (metodo 1) .....	pag. 60
4.6 Estrazione di stilbeni dal terreno di coltura (metodo 2) .....	pag. 61
4.7 Estrazione di stilbeni da cellule (metodo 2) .....	pag. 61
4.8 Preparazione dei campioni (metodo 2) .....	pag. 61
4.9 Preparazione degli standard per HPLC (metodo 2) .....	pag. 62
4.10 Analisi cromatografica (metodo 2) .....	pag. 64
4.11 Determinazione del contenuto di resveratrolo e di altri composti (metodo 2) .....	pag. 65
5. Quantificazione degli antociani totali .....	pag. 66
5.1 Estrazione e quantificazione degli antociani .....	pag. 66
6. Analisi proteomiche .....	pag. 66
6.1 Soluzioni necessarie .....	pag. 67
6.2 Frazionamento delle cellule .....	pag. 69
6.3 Estrazione delle proteine .....	pag. 69
6.4 Elettroforesi bidimensionale .....	pag. 70
6.5 Colorazioni dei gel .....	pag. 72
6.6 Analisi delle immagini dei gel .....	pag. 72

6.7 Spettrometria di massa .....	pag. 73
7. Analisi trascrizionali tramite northern blot .....	pag. 75
7.1 Soluzioni necessarie .....	pag. 76
7.2 Estrazione degli acidi nucleici .....	pag. 79
7.3 Quantificazione degli acidi nucleici .....	pag. 81
7.4 Elettroforesi monodimensionale .....	pag. 82
7.5 Preparazione delle sonde .....	pag. 83
7.6 Northern blot .....	pag. 84
7.7 Ibridazione .....	pag. 85
7.8 Sviluppo e quantificazione .....	pag. 86
8. Immunolocalizzazione della stilbene sintasi .....	pag. 87
8.1 Isolamento dei protoplasti .....	pag. 88
8.2 Fissaggio dei protoplasti .....	pag. 88
8.3 Marcatura .....	pag. 89
8.4 Osservazioni al microscopio confocale .....	pag. 90

## RISULTATI

1. Trattamento con chitosano .....	pag. 91
2. Analisi proteomiche su estratti proteici totali .....	pag. 97
3. Analisi trascrizionali tramite northern blot .....	pag. 106
4. Immunolocalizzazione dell'enzima STS .....	pag. 109
5. Analisi proteomiche su frazioni subcellulari .....	pag. 110
6. Colture in bioreattore .....	pag. 126
6.1 Bocchetti e fermentazione 1: passaggio di scala .....	pag. 126
6.2 Fermentazioni 2a e 3: saccarosio nel terreno .....	pag. 128
6.3 Fermentazioni 2a e 2b: tempo di permanenza in bioreattore ..	pag. 133
6.4 Fermentazioni 2c e 4: trattamento con chitosano 50 µg/mL e saccarosio .....	pag. 137
6.5 Fermentazioni 5 e 6: concentrazione cellulare dell'inoculo ....	pag. 142
6.6 Fermentazioni 7 e 8: trattamento con chitosano 100 µg/mL ...	pag. 147

## DISCUSSIONE

1. Elicitazione con chitosano: studi molecolari e metabolici .....	pag. 149
2. Colture di cellule di vite in bioreattore .....	pag. 158

## CONCLUSIONI

Conclusioni ..... pag. 165

## BIBLIOGRAFIA

Bibliografia citata ..... pag. 167

## RINGRAZIAMENTI

Ringraziamenti ..... pag. 177

# **ABSTRACT**

## **Chitosan effects on polyphenol compounds in grape cell cultures: molecular and metabolic approach**

Polyphenols, including flavonoids and stilbenes, are an essential part of human diet and constitute one of the most abundant and ubiquitous group of plant secondary metabolites. The level of these compounds is inducible by stress or fungal attack, so attempts are being made to identify likely biotic and abiotic elicitors and to better understand the underlying mechanism.

Resveratrol (3,5,4'-trihydroxystilbene), which belongs to the stilbene family, is a naturally occurring polyphenol, found in several fruits, vegetables and beverages including red wine. It is one of the most important plant polyphenols with proved benefic activity on animal health. In the last two decades, the potential protective effects of resveratrol against cardiovascular and neurodegenerative diseases, as well as the chemopreventive properties against cancer, have been largely investigated. The most important source of polyphenols and in particular resveratrol for human diet is grape (*Vitis vinifera*).

Since stilbenes and flavonoids play a very important role in plant defence responses and enviromental interactions, and their effects on human health seem promising, the aim of the research of this Thesis was to study at different levels the activation and the regulation of their biosynthetic pathways after chitosan treatment. Moreover, the polyphenol production in grape cells and the optimisation of cultural conditions bioreactor scale-up, were also investigated.

Cell suspensions were obtained from cv. Barbera (*Vitis vinifera* L.) petioles and were treated with a biotic elicitor, chitosan (50 µg/mL, dissolved in acetic acid) to promote phenylpropanoid metabolism. Chitosan is a D-glucosamine polymer from fungi cell wall and therefore mimes fungal pathogen attack.

Liquid cultures have been monitored for 15 days, measuring cell number, cell viability, pH and grams of fresh weight. The endogenous and released amounts of 7 stilbenes (*trans* and *cis* isomers of resveratrol, piceid and resveratrolside, and piceatannol), gallic acid, 6 hydroxycinnamic acids (*trans*-cinnamic, *p*-coumaric, caffeic, ferulic, sinapic and chlorogenic acids), 5 catechines (catechin, epicatechin, epigallocatechin-gallate (EGCG), epigallocatechin and epicatechin-gallate) and other 5 flavonoids (chalcon, naringenin, kaempferol, quercetin

and rutin) in cells and cultural medium, were measured by HPLC-DAD analysis and total anthocyanins were quantified by spectrophotometric analysis.

Chitosan was effective in stimulating *trans*-resveratrol endogenous accumulation with a sharp peak at day 4 (exceeding acetic acid and water controls by 36% and 63%, respectively), while it did not influence the production of the *cis*-isomer. Compared to both water and acetic acid controls, chitosan decreased the release of both *trans*- and *cis*-resveratrol respect to controls.

No effect was shown on the accumulation of single resveratrol mono-glucoside isomers, but considering their total amount, normalized for the relative water control, it was possible to evidence an increase in both accumulation and release of those compounds, in chitosan-treated cells, throughout the culture period and particularly during the second week.

Many of the analysed flavonoids and hydroxycinnamic acids were not present or detectable in trace amounts. Catechin, epicatechin and epigallocatechin-gallate (EGCG) were detectable both inside the cells and in the culture media, but chitosan did not affect their amounts. On the contrary, total anthocyanins have been stimulated by chitosan and their level, from day 4 to 14, was about 2-fold higher than in both controls, confirming macroscopic observations that treated suspensions showed an intense brown-red color, from day 3 onwards.

These elicitation results suggest that chitosan selectively up-regulates specific biosynthetic pathways, without modifying the general accumulation pattern of other flavonoids.

Proteins have been extracted from cells at day 4 of culture (corresponding to the production peak of *trans*-resveratrol) and separated by bidimensional electrophoresis. The 73 proteins that showed a consistently changed amount between untreated, chitosan and acetic acid (chitosan solvent) treated cells, have been identified by mass spectrometry. Chitosan induced an increase in stilbene synthase (STS, the resveratrol biosynthetic enzyme), chalcone-flavanone isomerase (CHI, that switches the pathway from chalcones to flavones and anthocyanins), pathogenesis-related proteins 10 (PRs10, a large family of defence proteins), and a decrease in many proteins belonging to primary metabolisms. A train of six distinct spots of STS encoded by the same gene and increased by chitosan, was detected on the 2-D gels, and related to the different phosphorylation degree of STS spots.

Northern blot analyses have been performed on RNA extracted from cells treated with chitosan and relative controls, using probes for STS, PAL (phenylalanine ammonia lyase, the first enzyme of the biosynthetic pathway), CHS (chalcone synthase, that shares with STS the same precursors), CHI and PR-10. The up-regulation of PAL, CHS and CHI transcript expression levels correlated with the accumulation of anthocyanins. The strong increase of



different molecular weight PR-10 mRNAs, correlated with the 11 PR-10 protein spots identified in proteomic analyses.

The sudden decrease in *trans*-resveratrol endogenous accumulation after day 4 of culture, could be simply explained by the diminished resveratrol biosynthetic activity due to the lower amount of biosynthetic enzymes. This might be indirectly demonstrated by northern blot expression analyses, that showed lower levels of phenylalanine ammonia lyase (PAL) and stilbene synthase (STS) mRNAs starting from day 4. Other possible explanations could be a resveratrol oxidation process and/or the formation of other different mono-, di-glucosides and resveratrol oligomers such as viniferins.

Immunolocalisation experiments performed on grape protoplasts and the subsequent analyses by confocal microscope, showed that STS, and therefore the resveratrol synthetic site, is mostly associated to intracellular membranes close to the cytosolic side of plasma membrane and in a smaller amount is localized in the cytosol. STS seemed not to be present inside vacuole and nucleus. There were no differences in the STS intracellular localisation between the different treatments. Since it was shown that stilbenes are largely released in the culture medium and that STS is a soluble protein, a possible interaction of STS with a plasma membrane transporter responsible for the extrusion of stilbenes in the culture medium, might be hypothesized. Proteomic analyses performed on subcellular fractions identified in the microsomal fraction 5 proteins taking part in channel complexes or associated with channels, that significantly changed their amount after chitosan treatment. In soluble and membrane fractions respectively 3 and 4 STS and 6 and 3 PR-10 have been identified. Proteomic results obtained from subcellular fractions substantially confirmed previous result obtained from total cell protein extracts and added more information about protein localisation and co-localisation.

The interesting results obtained on Barbera cell cultures with the aim to increase polyphenol (especially stilbenes) production, have encouraged scale up tests in 1 litre bioreactors. The first trial fermentation was performed in parallel with a normal time-course in 20 mL flasks, showing that the scale-up (bigger volume and different conditions) process influenced in a very relevant way stilbenes production.

In order to optimise culture parameters such as medium sucrose amount, fermentation length and inoculum cell concentration, few other fermentations were performed. Chitosan treatments were also performed. The modification of each parameter brought relevant variations in stilbenes and catechins levels, so that the production of a certain compound (or class of compounds) could be hypothetically promoted by modulating one or more culture

parameters. For example the catechin yield could be improved by increasing sucrose content and the time of fermentation.

The best results in stilbene yield were obtained in a 800 mL fermentation inoculated with 10.8 grams of cells and supplemented with chitosan. The culture was fed with MS medium added with 30 g/L sucrose, 25 µg/mL rifampicin and 50 µg/mL of chitosan, and was maintained at 24°C, stirred by marine impeller at 100 rpm and supplied of air at 0.16 L/min rate. Resveratrolside was the stilbene present in the larger amount, 3-5 times more than resveratrol. Because resveratrol glucosides are similarly active and more stable than free resveratrol, their production using a bioreactor could be a great advantage in an hypothetical industrial process. In my bioreactor tests, stilbenes were mainly released in the culture medium (60-80% of the total) and this fact could be another advantage for industrial applications, because it allows recovering the products directly from the culture medium without stopping the fermentation and/or killing the cells. In my best cultural conditions, it was possible to obtain 3.95 mg/L of stilbenes at day 4 (maximum resveratrol accumulation) and 5.13 mg/L at day 14 (maximum resveratrolside production).

In conclusion, chitosan effect in inducing *Vitis vinifera* defense mechanisms can be related to its ability to increase the intracellular content of a large spectrum of antioxidants, and in particular of resveratrol, its derivatives and anthocyanins. Its effect can be observed at transcriptional, proteomic (variation of soluble and membrane protein amounts) and metabolic (polyphenols production) level. The chitosan ability to elicit specific plant metabolisms can be useful to produce large quantities of antioxidant compounds from cell culture in bioreactor.

# **INTRODUZIONE**

## **1. COLTURA *IN VITRO* DI CELLULE E TESSUTI VEGETALI**

Per coltura *in vitro* si intende una serie di metodologie che consentono il mantenimento e lo sviluppo di parti di pianta (cellule, tessuti ed organi) su terreni di coltura a definita composizione chimica ed in condizioni sterili.

La storia delle colture vegetali *in vitro* è relativamente recente ma il loro sviluppo è stato rapido e promette ancora interessanti sviluppi per il futuro. Il primo passo nella loro storia fu fatto con le colture idroponiche, sviluppatesi a metà del XIX secolo in Germania, che consistono nella coltivazione di piante intere il cui apparato radicale è immerso in un sottile film di liquido nutritivo rinnovato periodicamente. I primi tentativi di colture di cellule e tessuti vegetali risalgono agli inizi del '900 e negli anni '40-'50 si standardizzarono terreni e metodiche. Nel '59 si sperimentò la prima coltura di cellule vegetali su larga scala e già negli anni '60-'70 cominciarono le applicazioni, prima con la propagazione clonale (inizialmente in Belgio ed in seguito in Italia, in Romagna) e poi, dagli anni '80-'90, con colture di cellule e tessuti per la produzione di composti chimici d'interesse (soprattutto alcaloidi per uso medico o farmaceutico, ma anche composti per l'industria alimentare e cosmetica) e coi primi brevetti in materia. Nel frattempo aumentarono le conoscenze di fisiologia cellulare e di biochimica vegetale, che permisero di cominciare a distinguere ed ottimizzare le metodologie per le colture di cellule eucariotiche vegetali ed animali e di microorganismi (Dörnenburg e Knorr, 1995; Kieran *et al.*, 1997; Bourgaud *et al.*, 2001).

### **1.1 Colture di cellule vegetali in scala di laboratorio**

Le colture vegetali *in vitro* in scala di laboratorio possono essere in terreno solido o liquido. La composizione del mezzo di coltura dipende dal tipo di cellule o di tessuti che si vogliono mantenere o fare sviluppare (Schenk e Hildebrandt, 1972). Esistono terreni standard, come B5 (Gamborg *et al.*, 1968) e MS (Murashige e Skoog, 1962), da ottimizzare per ogni coltura, ad esempio modificando il contenuto saccaridico o la composizione e/o il bilanciamento ormonale. Questi terreni contengono all'incirca gli stessi elementi ma con concentrazioni

diverse. Sono tutte soluzioni acquose in cui sono sempre presenti macroelementi (cioè ioni inorganici in elevata concentrazione:  $\text{Ca}^{++}$ ,  $\text{Mg}^{++}$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{PO}_4^{--}$ ,  $\text{SO}_4^{--}$ ,  $\text{Cl}^-$ , Fe chelato), microelementi (cioè basse concentrazioni di B, Cu, Mn, Mo, I, Zn, Co), zucchero (di solito glucosio o saccarosio), vitamine del gruppo B e regolatori della crescita come gli ormoni vegetali (solitamente basse concentrazioni di citochinine e più alte di auxine) (Schenk e Hildebrandt, 1972).

Per un buon sviluppo delle colture, oltre alla composizione del terreno, sono importanti vari fattori come il pH del mezzo di crescita, la temperatura, il fotoperiodo (cioè le ore di luce giornaliere), l'agitazione (per le sospensioni cellulari), ecc (Dörnenburg e Knorr, 1995).

Le cellule vegetali hanno una crescita molto più lenta di batteri, lieviti e cellule animali, ma in coltura hanno il metabolismo accelerato rispetto ai tessuti differenziati nelle piante intere, col risultato di una veloce proliferazione di biomassa e un ciclo biosintetico condensato. Ciò è alla base del maggior vantaggio dello studio e della produzione di metaboliti secondari *in vitro*: le vie biosintetiche diventano attive in tempi molto minori (2-4 settimane) che nella pianta (da settimane ad anni) (Dörnenburg e Knorr, 1995).

Una volta individuata la pianta iper-produttrice del composto di interesse, le colture di cellule vegetali possono essere allestite a partire da espianti di qualunque parte della pianta che vengono fatti dedifferenziare su terreno solido con formazione di callo, poi possono essere trasferiti in liquido oppure dal callo, fornendo le adeguate combinazioni ormonali, si può indurre la ricrescita di un determinato organo della pianta (organogenesi indiretta) o anche di piante intere (embriogenesi somatica). E' il caso di sottolineare come il fenomeno della rigenerazione sia espressione di una delle peculiari caratteristiche delle cellule vegetali: la totipotenza. Ciò dimostra, inoltre, come il fenomeno della differenziazione cellulare non implichi perdita od inattivazione permanente del corredo genetico, rendendo così possibile la riproduzione di organi o dell'intera pianta a partire da una qualunque cellula differenziata.

Su terreno solido, quindi, si sviluppa il callo, che può essere definito come una massa cellulare disorganizzata, costituita da elementi pressoché indifferenziati ed uniformi aventi carattere di cellule parenchimatiche altamente vacuolizzate. Colture ottimali sono quelle che danno biomassa a crescita rapida, soffice e friabile, così da ottenere in poco tempo grosse quantità di materiale. Trasferito in terreno liquido esso forma una sospensione di singole cellule o, più frequentemente, di aggregati di varia dimensione.

Le colture cellulari offrono diversi vantaggi rispetto alla coltivazione di piante: rapido incremento della biomassa, resa di metaboliti spesso maggiore, drastica riduzione dei tempi di

coltura, una indipendenza da fattori climatici/geografici/ambientali (variabile importantissima, invece, nelle coltivazioni di piante), possibilità di selezionare tra numeri elevatissimi di genotipi e fenotipi (mentre è limitato il numero di semi o piante coltivabili in serra od in campo), condizioni controllate e riproducibili, ecc. Spesso i vantaggi delle colture *in vitro* per la produzione di metaboliti vegetali superano anche quelli offerti dalla sintesi chimica, che solitamente è già economicamente più vantaggiosa dell'estrazione da pianta, soprattutto in caso di molecole complesse, chirali o con isomeri (Kieran *et al.*, 1997).

Inoltre, il passaggio *in vitro* di per sé consente un aumento della variabilità genetica, poiché le cellule del callo sono libere di proliferare in modo incontrollato, prescindendo da vincoli fisiologici e morfologici (variazione somaclonale durante le prime settimane di coltura). Sembra, cioè, che la rottura del normale programma ontogenetico allenti la pressione selettiva contro una serie di alterazioni che potenzialmente insorgerebbero *in vivo*, ma che sarebbero prontamente eliminate. Questa instabilità genetica ed epigenetica è allo stesso tempo un problema ed una risorsa, in quanto conduce alla stabilizzazione di linee cellulari o alla rigenerazione di piante geneticamente diverse (mutanti o varianti) fra loro e dalla pianta madre (Dörnenburg e Knorr, 1995). Altri tipi di alterazioni genetiche sono possibili su cellule o tessuti in coltura attraverso l'introduzione di DNA esogeno, realizzata con tecniche di ingegneria metabolica. Le cellule così trasformate sono in grado di rigenerare piante, definite transgeniche, contenenti i geni introdotti ed esprimenti i nuovi caratteri acquisiti (Bourgaud *et al.*, 2001).

## **1.2 Colture di cellule vegetali in grande scala**

Tramite passaggi di scala si può arrivare a colture cellulari vegetali in bioreattori industriali anche di decine di migliaia di litri (Dörnenburg e Knorr, 1995; Kieran *et al.*, 1997). Non si tratta di un semplice aumento di volume, ma questo processo comporta la valutazione e l'ottimizzazione di molti parametri che in laboratorio possono essere trascurati. Infatti, anche su grande scala, l'accrescimento della biomassa e la produzione di metaboliti secondari dipendono dalle caratteristiche genetiche della specie coltivata, dal tipo di terreno e dalle condizioni di coltura, però sono implicati ulteriori fattori. Ad esempio del terreno di coltura non è importante solo la composizione, ma lo sono anche le proprietà reologiche come la viscosità. Inoltre le condizioni di coltura importanti non sono più solo temperatura, pH e luce come in piccola scala, ma sono rilevanti anche la dimensione dell'inoculo e, soprattutto, aerazione ed agitazione, dalle quali dipende l'omogeneità del mezzo in termini di

distribuzione e disponibilità dei nutrienti, dei rifiuti metabolici, dell'ossigeno, della temperatura, ecc. Dall'aerazione dipendono anche la formazione di schiuma, da evitare, ed il rapporto  $O_2/CO_2$ , che influenza i processi metabolici e la stabilità dei prodotti. Pure l'agitazione (tipo e intensità) va adeguatamente messa a punti perché può compromettere vitalità cellulare e resa, anche se le cellule vegetali si sono rivelate più resistenti allo stress da taglio di quanto si pensasse. Anche la tendenza delle cellule vegetali a crescere in aggregati che sedimentano o aderiscono alle pareti, può condurre ad un sistema disomogeneo e quindi non ottimale in ogni punto e non riproducibile. Su grandi volumi, inoltre, possono esserci problemi di diffusione della luce (Kieran *et al.*, 1997; Bourgaud *et al.*, 2001).

La coltura in bioreattore di cellule vegetali comporta, quindi, maggiori problemi tecnici rispetto alle fermentazioni di microorganismi e richiede accorgimenti appositamente studiati, sia per la fermentazione che per il recupero del prodotto d'interesse. Un tipo di bioreattore particolarmente adatto è l'"airlift", in cui l'aria è immessa dal basso per miscelare oltre che ossigenare il sistema. Altre soluzioni sfruttano l'immobilizzazione delle cellule, che comporta numerosi vantaggi tecnici ed economici tra cui il fatto che le cellule siano più stabili e restino attive più a lungo, si osserva una crescita della produttività (grazie alla più stretta interazione cellula-cellula) e sono facilitati i processi in continuo ed il recupero dei metaboliti secreti (Dörnenburg e Knorr, 1995; Kieran *et al.*, 1997). Di questi ultimissimi anni è lo sviluppo di diverse tipologie di bioreattori che abbattano i costi d'impianto, come ad esempio i "fermentatori a sacchetti di plastica" (Bourgaud *et al.*, 2001).

Un altro fattore fondamentale da considerare, quando si parla di scala industriale per produzioni commerciali, è l'aspetto economico. La commercializzazione è ostacolata dalla fattibilità economica che necessita di un approccio integrato biologico ed ingegneristico. In generale per migliorare il processo occorre conoscere bene la via di biosintesi, il suo possibile legame con la cinetica di crescita, la morfologia del sistema, le interazioni cellula-cellula e la reazione di sintesi, ma è necessario anche avere un impianto adeguato ed un buon sistema di recupero del prodotto (Kieran *et al.*, 1997). Uno svantaggio dei composti vegetali, rispetto a molti di origine animale o microbica, è che spesso sono prodotti a basso o medio valore di mercato (Bourgaud *et al.*, 2001).

### **1.3 Colture di cellule di vite**

Per quel che riguarda la vite (*Vitis vinifera* L.), molte sue colture *in vitro* sono state ottenute con successo nell'ultimo secolo a partire da numerose cultivar. E' stata cresciuta su terreni

solidi e liquidi di vario tipo e con concentrazioni ormonali diverse: i risultati migliori sono stati ottenuti con i terreni B5 (Gamborg *et al.*, 1968) e MS (Murashige e Skoog, 1962) con bassi o nulli livelli di citochinine (come preferito dalle specie dicotiledoni) e concentrazioni maggiori di auxine.

Con l'aiuto di tecniche cromatografiche, spettroscopiche e di NMR è stata dimostrata la produzione, in tutte queste colture, di antociani, proantocianidine, catechine, epicatechine e fitoalessine (Waffo Tegu *et al.*, 1996a). Queste ultime sono particolarmente importanti nella difesa verso i patogeni e sono presenti anche negli acini d'uva e nel vino rosso, tramite i quali entrano nella dieta umana. Le principali fitoalessine prodotte dalle *Vitaceae* appartengono alla famiglia degli stilbeni e sono rappresentate dal resveratrolo e dai suoi derivati quali viniferine, pterostilbene, piceide, resveratrolside, astringina, ecc (Jeandet *et al.*, 2002).

Le sospensioni cellulari di vite sono state usate per studiare e produrre composti biologicamente attivi (Decendit e Mérillion, 1996; Decendit *et al.*, 1996; Waffo Tegu *et al.*, 1996a; Waffo Tegu *et al.*, 1996b; Waffo Tegu *et al.*, 1998; Krisa *et al.*, 1999; Decendit *et al.*, 2002; Ferri, 2005; Franceschetti *et al.*, 2005; Tassoni *et al.*, 2005; Ferri *et al.*, 2007; Righetti *et al.*, 2007).

Molti studi di produzione di vari metaboliti, di embriogenesi somatica, di trasformazione genica, ecc, sono stati condotti a partire da protoplasti. In particolare, quelli di vite sono classificati fra i recalcitranti perché la digestione enzimatica della parete cellulare produce numerosi cambiamenti metabolici fra cui l'incremento della produzione dei radicali dell'ossigeno (AOS, activated oxygen species), che portano i protoplasti stessi in condizioni di stress a cui molti non sopravvivono, quindi con una resa non ottimale, ma sufficiente per iniziare una coltura che duri qualche settimana. Inoltre, nonostante l'aumento di AOS, il sistema antiossidante di difesa viene solo parzialmente attivato, intaccando così il potenziale rigenerativo, ma portando ad accumulo di fitoalessine (Commun *et al.*, 2003).

Le sperimentazioni di colture di vite in bioreattore sono state fino ad ora poco numerose. La prima risale al 1996 ed aveva il duplice scopo di produrre composti antiossidanti e di confrontare la resa di biomassa e di metaboliti in fiasca ed in un bioreattore da 20 L. In quel caso si osservò come il passaggio di scala non influenzasse la crescita cellulare e la biosintesi di antociani, ma inibisse leggermente la produzione di tannini condensati, *trans*-piceide e catechine (Decendit *et al.*, 1996). Negli anni successivi, lenti progressi sono stati fatti nell'ottimizzazione della coltura di cellule di vite su scala pre-industriale, affrontando la

questione sia dal punto di vista biologico (Aumont *et al.*, 2004) che ingegneristico (Nagamori *et al.*, 2001; Honda *et al.*, 2002) e portando a discreti risultati.

## **2. SISTEMI DI DIFESA DELLE PIANTE**

Le piante hanno evoluto numerosi sistemi per difendersi dall'attacco di predatori e microorganismi patogeni e per sopravvivere in un ambiente ostile. Alcuni meccanismi sono il risultato di secoli di evoluzione e sono macroscopici e permanenti, come la modificazione morfologica e strutturale di organi (ad esempio fusto trasformato in spine caulinari per dissuadere gli erbivori). Molti sistemi di difesa e di resistenza alle malattie si attuano, invece, a livello cellulare e sono costitutivi o attivati al bisogno (Jeandet *et al.*, 2002). Fra queste reazioni di difesa inducibili, vi sono produzione *de novo* o maggior espressione di composti e molecole, quali fitoalessine, fenilpropanoidi, isoprenoidi (terpeni) e alcaloidi, proteine pathogenesis-related (PR) e parecchi enzimi di difesa (come fenilalanina-ammonio liasi (PAL) e perossidasi) (Iriti e Faoro, 2004). Altre difese locali sono la risposta ipersensibile (necrosi delle cellule ospiti nella zona circostante l'infezione) e la formazione di callosio e lignina (per inspessire la parete cellulare come barriera fisica o per intrappolare i patogeni in materiale secreto extracellulare). Vi sono anche risposte sistemiche che inducono resistenza in parti della pianta lontane dal sito d'infezione (Darvill e Albersheim, 1984; Hadwiger, 1999; Pieterse e van Loon, 1999; Bézier *et al.*, 2002).

### **2.1 Fitoalessine**

Le fitoalessine sono state definite nel 1981 come “composti antimicrobici a basso peso molecolare sintetizzate dalle piante ed in esse accumulati in seguito all'attacco da parte di microorganismi” (Darvill e Albersheim, 1984; Jeandet *et al.*, 2002). Sono metaboliti secondari quasi assenti nelle piante sane: gli oltre 20 enzimi che catalizzano la sintesi delle fitoalessine sono sintetizzati *de novo* al momento del bisogno (Darvill e Albersheim, 1984; Commun *et al.*, 2003). Vengono accumulate nel sito di infezione e, svolta la loro funzione di difesa e resistenza alle malattie, sono catabolizzate o degradate dai microorganismi ma anche dalla pianta stessa (Darvill e Albersheim, 1984).

Le fitoalessine di piante diverse hanno in genere una struttura di base comune e le similitudini aumentano col ridursi della distanza filogenetica fra le specie. La capacità di accumularle è



molto diffusa, se non addirittura ubiquitaria, fra le piante superiori, sia monocotiledoni che dicotiledoni, ma non è l'unico modo che la pianta ha per reagire a un tentativo di infezione. La quantità di fitoalessine accumulata è molto variabile e dipende da numerosi fattori, quali lo stato fisiologico della pianta, il microorganismo patogeno o lo stimolo elicitore, il background genetico (sia di cultivar che individuale), ecc. (Darvill e Albersheim, 1984).

Numerose evidenze sperimentali suffragano la loro funzione di resistenza alle malattie. È stato dimostrato che il loro accumulo nel sito d'infezione è abbastanza veloce ed in quantità sufficiente da inibire la crescita di funghi e batteri. È stato anche provato che inattivando la PAL, l'enzima iniziale della via biosintetica di stilbeni e altre fitoalessine, non se ne ha un accumulo sufficiente e ne consegue un calo della resistenza alle infezioni. Una conferma del ruolo che le fitoalessine hanno nel conferire resistenza ai patogeni viene da studi genetici sui funghi che hanno dimostrato come ad una più alta virulenza sia associata una maggiore capacità di detossificare questi composti, anche se questa proprietà non è sufficiente a rendere il microorganismo patogeno (Darvill e Albersheim, 1984).

Le fitoalessine sono antibiotici aspecifici, nel senso che agiscono verso procarioti ed eucarioti (avendo anche una certa tossicità su cellule di mammifero e di piante superiori) e, a parità di concentrazione, sono meno efficaci di numerosi pesticidi commerciali. Hanno, però, il vantaggio di essere prodotte ed accumulate direttamente dove servono (Darvill e Albersheim, 1984; Jeandet *et al.*, 2002).

Gli elicitori delle fitoalessine, cioè quelle molecole che ne stimolano la produzione, sono di tipo biotico (carboidrati complessi della parete cellulare della pianta o fungina, enzimi microbici, ecc) o abiotico (metalli pesanti, luce UV, ecc). Gli elicitori biotici sono coinvolti nell'interazione fra pianta e patogeno, mentre quelli abiotici sono legati alle condizioni ambientali. I diversi stimoli che conducono alla sintesi di fitoalessine agiscono secondo meccanismi differenti, comunemente attivando un elicitore biotico endogeno (come acido salicilico, etilene o giasmonati), cioè già presente ma inattivo nelle cellule sane, oppure inibendo la degradazione delle fitoalessine presenti (Darvill e Albersheim, 1984; Pieterse e van Loon, 1999).

I meccanismi d'azione delle fitoalessine sono ancora oggetto di studio. Alle concentrazioni fisiologiche sono prevalentemente citostatici, ma sono stati osservati anche effetti tossici. Il meccanismo generale d'azione più probabile sembra essere l'inibizione di bersagli metabolici specifici nelle cellule sensibili (batteri o funghi), probabilmente nella membrana cellulare, di cui viene alterata la permeabilità (Darvill e Albersheim, 1984).

Riassumendo, quindi, ad una infezione o ad una elicitazione transiente segue sintesi ed accumulo di mRNA da cui sono tradotti gli enzimi della via biosintetica ed infine sopraggiunge l'accumulo delle fitoalessine vere e proprie. Successivamente si assiste alla scomparsa dei composti, anche in assenza di microorganismi che, però possono accelerarne la degradazione e limitare il livello massimo raggiunto nell'accumulo. Il bilancio fra velocità di sintesi e di detossificazione (ad opera sia delle piante che del patogeno) decide l'esito dell'infezione.

## **2.2 Proteine PR (pathogenesis-related)**

Il termine “pathogenesis-related” (PR) è stato proposto nel 1980 per indicare una classe di proteine sintetizzata nelle piante in risposta a infezione di patogeni. Una definizione successiva qualifica le proteine PR come polipeptidi di origine vegetale codificati dall'ospite che non sono presenti nelle piante sane, ma che sono sintetizzati in risposta a situazioni patologiche o, più in generale, di stress (van Loon e van Strien, 1999; Bantignies *et al.*, 2000). Poi si osservò che alcune isoforme sono costitutivamente espresse in molte piante sane e che questo livello basale costitutivo aumenta molto in seguito all'attacco di un patogeno (Pinto *et al.*, 2005; Kortekamp, 2006). Infine è stato dimostrato che alcune proteine PR non rispondono a situazioni di stress (o almeno non solo), ma sono sintetizzate dinamicamente durante lo sviluppo della pianta sana, cioè sottostanno a regolazioni legate al differenziamento tessuto-specifico e non ad induzione o espressione da parte del patogeno (Pinto *et al.*, 2005; Monteiro *et al.*, 2007). La catalogazione di questo ultimo tipo di proteine come PR è controversa: alcuni autori preferiscono considerarle una famiglia a parte definendole “PR-like”, omologhe alle PR in sequenza amminoacidica, struttura e attività enzimatica, ma sottoposte ad un diverso sistema di controllo (van Loon e van Strien, 1999; Bantignies *et al.*, 2000).

Il ruolo primario delle proteine PR, comunque, rimane legato alla reazione a vari tipi di stress. La loro produzione rappresenta un elemento del repertorio di difesa attiva (Bantignies *et al.*, 2000), in particolare sono sintetizzate ed accumulate anche lontano dal sito di infezione in associazione con la resistenza sistemica acquisita (SAR) contro funghi, batteri e virus (van Loon e van Strien, 1999). Insieme alle PR sono espressi anche gli altri componenti del sistema di difesa, come ad esempio le fitoalessine (Lo e Nicholson, 1998; Tassoni *et al.*, 2005). Le PR possono essere anche elicitate, sia *in vivo* sia *in vitro*, ad esempio con chitosano o UV o metil giasmonato (Lo e Nicholson, 1998; Hadwiger, 1999; Tassoni *et al.*, 2005; Kortekamp, 2006).

Le proteine PR sono prodotte da molte piante, anche di specie lontane fra loro, e questo testimonia il loro ruolo generale nell'adattamento a condizioni di stress (van Loon e van Strien, 1999). Sono codificate da famiglie multigeniche con specificità diverse (di tessuto, di stadio di sviluppo, ecc) (van Loon e van Strien, 1999). Di solito si tratta di geni dominanti che conferiscono resistenza specie-specifica a malattie e spesso la loro funzione dipende dalla interazione fra i prodotti di un gene R (resistenza) della pianta con un gene Avr (avirulenza) del patogeno (Hadwiger, 1999). I meccanismi d'azione sono molto vari e, in gran parte dei casi, ancora poco chiari, ma si sa che alcune proteine PR agiscono direttamente contro il patogeno o le sue strutture di infezione, mentre altre conducono alla produzione di elicitori che stimolano il meccanismo di difesa della pianta (Kortekamp, 2006).

Inizialmente le proteine PR furono classificate in 5 famiglie sulla base del loro peso molecolare, del punto isoelettrico, della localizzazione e dell'attività biologica. Poi le si suddivise in 11 famiglie secondo la loro sequenza amminoacidica, le interazioni serologiche e/o l'attività biologica, ma nel '98 se ne identificarono delle nuove e le famiglie ad oggi sono 14 (Van Loon e Van Strien, 1999; Bantignies *et al.*, 2000). Le PR-1 sono le uniche la cui funzione è totalmente sconosciuta; le PR-2 sono endo- $\beta$ -1,3-glucanasi; le PR-3, -4, -8 e -11 sono endochitinasi specifiche per substrati diversi; le PR-5 sono osmotine (proteine che permeabilizzano le membrane formando dei pori transmembrana); le PR-6 sono inibitori di proteasi; le PR-7 sono endoproteinasi; le PR-9 sono perossidasi; le PR-10 sono strutturalmente correlate con ribonucleasi; le PR-12 sono defensine vegetali (piccoli polipeptidi di 45-54 amminoacidi, con una carica netta positiva, ad azione antifungina); le PR-13 sono tionine (proteine basiche ricche di cisteina ad effetto antifungino); le PR-14 sono LTPs (lipid transfer proteins, capaci di legare e scambiare molecole lipidiche fra membrane diverse) (Van Loon e Van Strien, 1999; Kortekamp, 2006). Almeno 9 famiglie, fra cui PR-1, -3, -10 e -14, sono coinvolte nelle allergie alimentari ed al polline (van Loon e van Strien, 1999).

Di particolare interesse per questo lavoro di tesi sono le PR-10 e le proteine PR di *Vitis vinifera*.

Le oltre 100 PR-10 conosciute sono sintetizzate da molte famiglie di piante (lupino, sorgo, soia, patata, riso, pisello, fagiolo, asparago, astragalo, erba medica, vite, pino, giglio, ecc.) (Lo e Nicholson, 1998; Bantignies *et al.*, 2000; Pinto *et al.*, 2005; Tassoni *et al.*, 2005; Yan *et al.*, 2008). Forse non sono un reale componente della prima linea di difesa verso il potenziale patogeno, perché i loro geni sono espressi in tutti gli stadi di sviluppo della pianta sana, ma si

osserva accumulo del loro trascritto già poche ore dopo infezione fungina. In alcune specie, inoltre, vi è una espressione costitutiva che fa supporre possano appartenere ad una sorta di sistema di prevenzione, un meccanismo di difesa pre-infezione (Kortekamp, 2006). In generale sono proteine intracellulari (ma in *Lupinus albus* sono state osservate anche extracellulari, associate al tessuto vascolare delle radici mature (Pinto *et al.*, 2005)), acide, con peso molecolare di 16-19 kDa, senza peptide segnale, resistenti alle proteasi. Sono indotte in risposta a infezioni di patogeni e stress biotici e abiotici, ma sono anche regolate dallo sviluppo (Pinto *et al.*, 2005; Tassoni *et al.*, 2005; Yan *et al.*, 2008). La loro funzione biologica esatta è ancora sconosciuta, ma hanno similarità di struttura con ribonucleasi citosoliche ed allergeni del polline (Bantignies *et al.*, 2000; Pinto *et al.*, 2005; Kortekamp, 2006). Recentemente è stata dimostrata l'attività ribonucleasica di tipo II delle PR-10 di *Astragalus mongholicus* (Yan *et al.*, 2008).

La vite (*Vitis vinifera*) sintetizza molte PR di varie famiglie (PR-2, -3, -4, -5, -8, -10, -11) (Kortekamp, 2006; Monteiro *et al.*, 2007). È stato osservato come esse rispondano diversamente sia alla stessa infezione sia a diversi potenziali patogeni, e come cultivar differenti ne utilizzino uno spettro diverso. In genere, comunque, le PR-10 sono le più elicitate (Kortekamp, 2006).

La quantità e la proporzione reciproca delle PR nella vite dipendono dalla specie e dalla cultivar, dalle precise condizioni ambientali e patologiche occorse durante la crescita vegetativa della pianta e dalle pratiche agricole utilizzate, ma l'influenza dei fattori ambientali e colturali sembra prevalere sulla genetica nel determinare l'esatto repertorio di polipeptidi accumulati nell'uva matura (Monteiro *et al.*, 2007). Negli acini sani, le PR sono sintetizzate in maniera dipendente dallo sviluppo come parte del normale processo di maturazione: durante la "véraison" (termine usato dai viticoltori per indicare l'inizio della maturazione) inizia l'espressione dei geni PR, mentre nello stesso periodo si osserva un calo generale della sintesi proteica. Infatti, durante lo sviluppo della vite e la maturazione dell'uva, la concentrazione delle proteine solubili totali negli acini aumenta esponenzialmente, ma, parallelamente, la diversità dei polipeptidi si riduce. Le proteine PR seguono uno schema di sintesi e accumulo differente: la loro concentrazione aumenta durante lo sviluppo così come la loro percentuale sul totale delle proteine (che raggiunge circa il 75 % alla maturità dell'acino), ma cala la loro diversità. Infatti le PR di vite sono sintetizzate in un'ampia varietà (presenza di numerose famiglie geniche), ma alla maturità, quando sono più concentrate, solo poche isoforme sono rappresentate (Monteiro *et al.*, 2007).

Proteine appartenenti a diverse famiglie di PR sono presenti anche nel vino. La vinificazione può addirittura essere vista come un processo di purificazione delle proteine PR, ma non è un effetto ricercato dagli enologi perché la loro presenza inficia la stabilità e la limpidezza del vino (Monteiro et al., 2007).

### 3. STILBENI

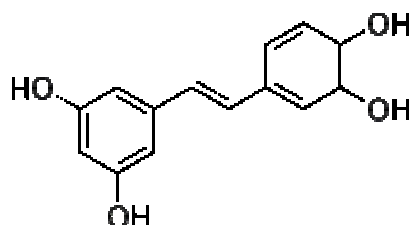
Gli stilbeni sono la principale classe di fitoalessine prodotte nelle *Vitaceae*, dove svolgono principalmente una funzione di difesa della pianta dall'attacco di microorganismi patogeni, soprattutto funghi (Soleas et al., 1997; Jeandet et al., 2002).

Il genere *Vitis*, della famiglia delle *Vitaceae*, comprende diverse specie, come *vinifera* (la più comune in Europa), *riparia* (vite americana), *rupestris*, *lambrusca*, *pseudoreticulata*, ecc., da cui sono stati ottenuti numerosi ibridi interspecifici. Tutte queste specie sono in grado di sintetizzare stilbeni, ma con differenze in termini di induzione e regolazione. In generale sembra che le viti americane e gli ibridi interspecifici producano quantità maggiori di resveratrolo rispetto alle varietà europee e che, soprattutto, la velocità di sintesi sia superiore nei genotipi resistenti alle malattie fungine. Oltre al fattore genetico, molto importanti per la biosintesi degli stilbeni sono le condizioni ambientali e colturali. Ad esempio, poiché l'infezione da funghi è molto comune nei climi più freddi, le uve che crescono in quegli ambienti contengono concentrazioni maggiori di stilbeni (Kopp, 1998).

La famiglia degli stilbeni raccoglie una trentina di composti (Soleas et al., 1997) che hanno come scheletro comune la struttura del resveratrolo (3,5,4'-triidrossistilbene) (Soleas et al., 1997; Jeandet et al., 2002). Ad esempio vi sono la viniferine, dimeri od oligomeri di *trans*-resveratrolo la cui biosintesi è catalizzata da enzimi perossidasi tramite dimerizzazione ossidativa. La loro tossicità verso un ampio spettro di funghi patogeni è molto maggiore di quella del resveratrolo in forma libera (Soleas et al., 1997; Jeandet et al., 2002; Commun et al., 2003). Lo stesso vale per lo pterostilbene (3,5-dimetossi-4'-idrossistilbene), un derivato dimetilato del resveratrolo, che grazie ai gruppi metilici è lo stilbene più tossico (ma è attivo solo a pH acido). L'accumulo di pterostilbene negli acini d'uva è generalmente basso (10-20 volte meno del resveratrolo) ed incostante (Soleas et al., 1997), soprattutto nelle bacche mature (Adrian et al., 2000; Jeandet et al., 2002), ma anche in colture di protoplasti (Commun

*et al.*, 2003). Forse lo pterostilbene non deriva dalla stessa via metabolica degli altri stilbeni e sottostà ad un controllo metabolico differente.

Un altro componente della famiglia è il piceatannolo (*trans*-3,3',4,5'-tetraidrossistilbene), caratterizzato dall'aver 4 gruppi ossidrilici (figura 1). Viene accumulato in tempi (e fasi di maturazione) diversi da quelli del resveratrolo, quindi l'aggiunta del quarto ossidrile deve avvenire ad opera di un enzima specifico a valle di quello che sintetizza il resveratrolo (Baverasco *et al.*, 2003). La sua attività fungicida *in vivo* è 10-100 volte più forte di quella del *trans*-resveratrolo (Baverasco *et al.*, 2003). Nelle cellule umane, il piceatannolo è in grado di inibire la proliferazione di cellule tumorali promuovendo l'apoptosi ed arrestando il ciclo cellulare. È stato addirittura ipotizzato che gli effetti antiproliferativi del resveratrolo siano il risultato di una sua conversione a piceatannolo ad opera del citocromo P450 1B1, espresso specificatamente nelle cellule tumorali (King *et al.*, 2006).



**Figura 1.** Struttura del *trans*-piceatannolo (*trans*-3,3',4,5'-tetraidrossistilbene).

Vari ed importanti sono i derivati glucosilati del resveratrolo, che sono la forma in cui le cellule vegetali immagazzinano gli stilbeni, e di cui ultimamente si stanno rivalutando positivamente le funzioni biologiche (si veda il paragrafo 3.3).

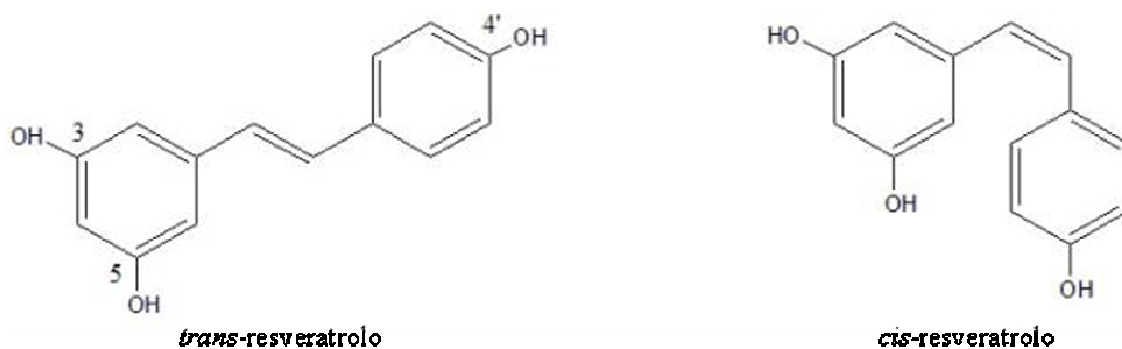
Diversi autori hanno eseguito studi su colture cellulari di *V. vinifera* per investigare fattori capaci di indurre e/o modificare biosintesi e metabolismo degli stilbeni (Waffo Tegu *et al.*, 1998; Krisa *et al.*, 1999; Decendit *et al.*, 2002; Tassoni *et al.*, 2005; Ferri *et al.*, 2007). Uno degli obiettivi principali è quello di ottimizzare la produzione *in vitro* di stilbeni. In particolare l'elicitazione della via biosintetica è stata studiata in sospensioni cellulari della cv. Barbera trattate con metil-giasmonato, analizzando l'accumulo degli isomeri *trans* e *cis* ed il profilo di espressione proteica mediante analisi proteomica (Tassoni *et al.*, 2005).

Un altro tipo di studi, molto più numerosi di quelli riguardante la produzione, ha dato promettenti risultati in questi ultimi anni: quelli che indagano i numerosi potenziali effetti benefici degli stilbeni sulla salute umana. Tuttavia servono ulteriori approfondimenti sui loro reali effetti *in vivo*, sulla eventuale tossicità, sulla biodisponibilità e sul metabolismo

all'interno dell'organismo umano (Orsini *et al.*, 1997; Lin e Tsai, 1999; Frémont, 2000; Pervaiz, 2003; Walle *et al.*, 2004; Baur *et al.*, 2006; King *et al.*, 2006 ).

### 3.1 Resveratrolo

Il resveratrolo (3,5,4'-triidrossistilbene), rappresentato in figura 2, è un fitopolifenolo a basso peso molecolare (228 Da) appartenente alla famiglia degli stilbeni (Langcake e Pryce, 1976; Soleas *et al.*, 1997; Jeandet *et al.*, 2002). Esiste nelle forme diastereoisomeriche *cis* e *trans*, entrambe presenti in molte piante, e l'isomerizzazione da *trans* a *cis* è favorita dall'esposizione alle radiazioni ultraviolette o da processi biologici (ad esempio nella vite la forma *cis* è maggiormente presente nel vino rispetto all'uva a causa di una isomerizzazione operata dai lieviti durante la fermentazione) (Orallo, 2006).



**Figura 2.** Struttura del resveratrolo (3,5,4'-triidrossistilbene) nelle due forme diastereoisomeriche *cis* e *trans*.

Una delle fonti più ricche di resveratrolo, oltre che la prima in cui storicamente fu isolato, è la radice di *Polygonum capsdatum* (o Ko-jo-kon), molto usata nella medicina popolare orientale, i cui effetti terapeutici su vasi sanguigni, cuore e fegato sono stati documentati decenni prima dell'identificazione del principio attivo (Soleas *et al.*, 1997; Frémont, 2000; Pervaiz, 2003). Sebbene sia presente in almeno 72 specie di piante (King *et al.*, 2006), come eucalipto, abete rosso e giglio, e in altri cibi come arachidi e loro derivati (di grande rilevanza nella dieta nord-americana), le fonti di resveratrolo più rilevanti per la dieta umana sono gli acini di *Vitis vinifera*, gli stessi usati per fare il vino. Per questo motivo lo si studia soprattutto nella vite. Numerosi composti trovati nell'uva sono implicati in dati epidemiologici dimostranti una correlazione inversa fra il consumo di vino rosso e l'insorgenza di malattie cardiovascolari. L'interesse per il resveratrolo, infatti, è enormemente aumentato da quando fu indicato come la possibile spiegazione del "Paradosso francese", che è l'apparente efficacia del moderato consumo di vino rosso di ridurre il rischio di malattie cardiovascolari (Kopp,

1998). Oggi il resveratrolo è ricercato dall'industria (farmaceutica, alimentare, cosmetica, ecc.) e viene studiato dai ricercatori come un antiossidante, un agente anti-cancro e un fitoestrogeno.

La prima pubblicazione sulla presenza di *trans*-resveratrolo negli acini d'uva è del 1976 (Langcake e Pryce, 1976), ma fu solo nei primi anni '90 che lo si individuò nel vino (Siemann e Creasy, 1992) e si cominciò a studiarlo e ad approfondire le sue attività biologiche ed i suoi potenziali effetti benefici sugli animali ed in particolare sull'uomo (Soleas *et al.*, 1997; Pervaiz, 2003). L'importanza della vite come pianta commestibile fa della *Vitis vinifera* un buon sistema modello per studi sul miglioramento delle proprietà nutraceutiche di cibi di origine vegetale.

Il resveratrolo e gli altri stilbeni sono prodotti in diverse parti della vite (buccia dell'acino, foglie, fiori, tralci, radici, semi, raspi), ma la massima concentrazione è nella buccia degli acini e nelle foglie (Frémont, 2000; Bavaresco *et al.*, 2006; Orallo, 2006). Concentrazione e composizione degli stilbeni nella pianta dipendono anche dal processo di sviluppo, ad esempio nell'acino tendono a calare durante la maturazione, forse a causa di una competizione per i substrati che sono comuni alla biosintesi dei flavonoidi. Le bucce fresche contengono alcune decine di µg/g di stilbeni, con significative differenze fra i diversi composti e fra uva rossa e uva bianca (Frémont, 2000). Nel vino sono presenti nell'ordine di grandezza dei mg/L ed il resveratrolo (*cis* e *trans*, in un rapporto di 0,3-0,95) è mediamente 10-100 volte maggiore nel vino rosso che nel bianco. Nel succo d'uva (bevanda non fermentata e nel cui processo di produzione le bucce sono rimosse immediatamente dopo la spremitura) se ne ritrova meno di 0,1 µg/L. Uno dei motivi per cui la concentrazione di resveratrolo è significativamente più alta nel vino rosso che nel bianco, è che bucce e vinacce sono rimosse prima nella vinificazione in bianco, diminuendone la quantità estratta. Le concentrazioni di resveratrolo e stilbeni presenti nel vino sono il risultato della combinazione di più variabili quali il processo di vinificazione (lieviti usati nella fermentazione, tempo di macerazione di bucce e semi, chiarificazione, ecc), la varietà dell'uva, l'area geografica ed il clima in cui è cresciuta la vite, le pratiche colturali, ecc. (Soleas *et al.*, 1997; Frémont, 2000; Landrault *et al.*, 2001; Gambuti *et al.*, 2004; Bavaresco *et al.*, 2006; Musiani *et al.*, 2006). Ottimizzare i processi di campo e di cantina, per aumentare la presenza di stilbeni in uve e vini senza manipolare geneticamente la vite, porta ad un duplice vantaggio: piante con accresciuta resistenza alle malattie e prodotti alimentari con migliori proprietà nutraceutiche (Bavaresco *et al.*, 2006).



Nella pianta, il resveratrolo è presente ad un livello basale, ma la sua produzione può essere indotta in risposta a stimoli biotici o abiotici, quale l'infezione da fungo da *Botrytis cinerea* (Langcake e Pryce, 1976), stress da ferita (Langcake e Pryce, 1976), irradiazione UV (Adrian *et al.*, 2000; Commun *et al.*, 2003), esposizione a metalli pesanti (Adrian *et al.*, 1996) e trattamento con ozono (Schubert *et al.*, 1997).

Negli ultimi anni molta attenzione è stata rivolta agli effetti biologici degli stilbeni, e del resveratrolo in particolare, sulla salute umana. Numerosi esperimenti che hanno dimostrato il potere benefico del resveratrolo sono stati condotti *in vitro*, *ex vivo* e su animali (Soleas *et al.*, 1997) e recentemente sono state avviate anche sperimentazioni cliniche sull'uomo.

Questa molecola possiede proprietà antiossidanti tali da poter prevenire l'insorgenza di malattie cardiovascolari, come l'arteriosclerosi, modulando il metabolismo dei lipidi, inibendo l'ossidazione delle lipoproteine a bassa densità (LDL) e l'aggregazione delle placche arteriosclerotiche (Soleas *et al.*, 1997; Lin e Tsai, 1999; Frémont, 2000). Inoltre è stato dimostrato che il resveratrolo agisce come agente chemopreventivo nei confronti di diversi tipi di cancro già a basse concentrazioni ( $< 1 \mu\text{M}$  in animali), interferendo con le fasi di inizio, progressione e promozione del tumore, e sopprimendo gli eventi finali della carcinogenesi, come l'angiogenesi e la formazione di metastasi (Soleas *et al.*, 1997; Frémont, 2000; Soleas *et al.*, 2002).

La similarità di struttura fra resveratrolo e il dietilstilbestrolo (un estrogeno di sintesi non steroideo, impiegato in passato come farmaco), fa dello stilbene un fitoestrogeno capace di contribuire alla cardioprotezione (Frémont, 2000). Infine, recentemente è stato dimostrato che il resveratrolo può allungare e migliorare la qualità della vita di diverse specie, comprese *Saccharomyces cerevisiae*, *Drosophila melanogaster* e topo (Howitz *et al.*, 2003; Baur *et al.*, 2006; Valenzano *et al.*, 2006).

Gli effetti sulla salute umana dipendono dalla biodisponibilità della molecola e dalla dose. Già dai primi anni '80 è stato dimostrato che il resveratrolo è assorbito a livello intestinale e quindi può essere somministrato per via orale tramite dieta o farmaci (Frémont, 2000; Walle *et al.*, 2004). Negli ultimi anni si stanno chiarendo i meccanismi di questo processo: il resveratrolo può attraversare le membrane cellulari per diffusione passiva e quindi entra nelle cellule epiteliali dell'intestino in modo rapido e non direzionale, lì (o nel fegato) subisce immediatamente reazioni di glucuronazione o sulfonazione all'interno dei microsomi e poi entra nel sistema circolatorio (Aumont *et al.*, 2001; Henry-Vitrac *et al.*, 2006; King *et al.*, 2006). Le forme sulfonate sono inattive al punto che questo sembra essere il maggior fattore

limitante alla biodisponibilità di resveratrolo (Walle *et al.*, 2004). La coniugazione all'acido glucuronico sembra essere un modo per proteggere la molecola che, in questa forma, può raggiungere tutti gli organi e i tessuti ed essere riattivata dove serve da enzimi  $\beta$ -glucuronidasi (Aumont *et al.*, 2001; Henry-Vitrac *et al.*, 2006; King *et al.*, 2006).

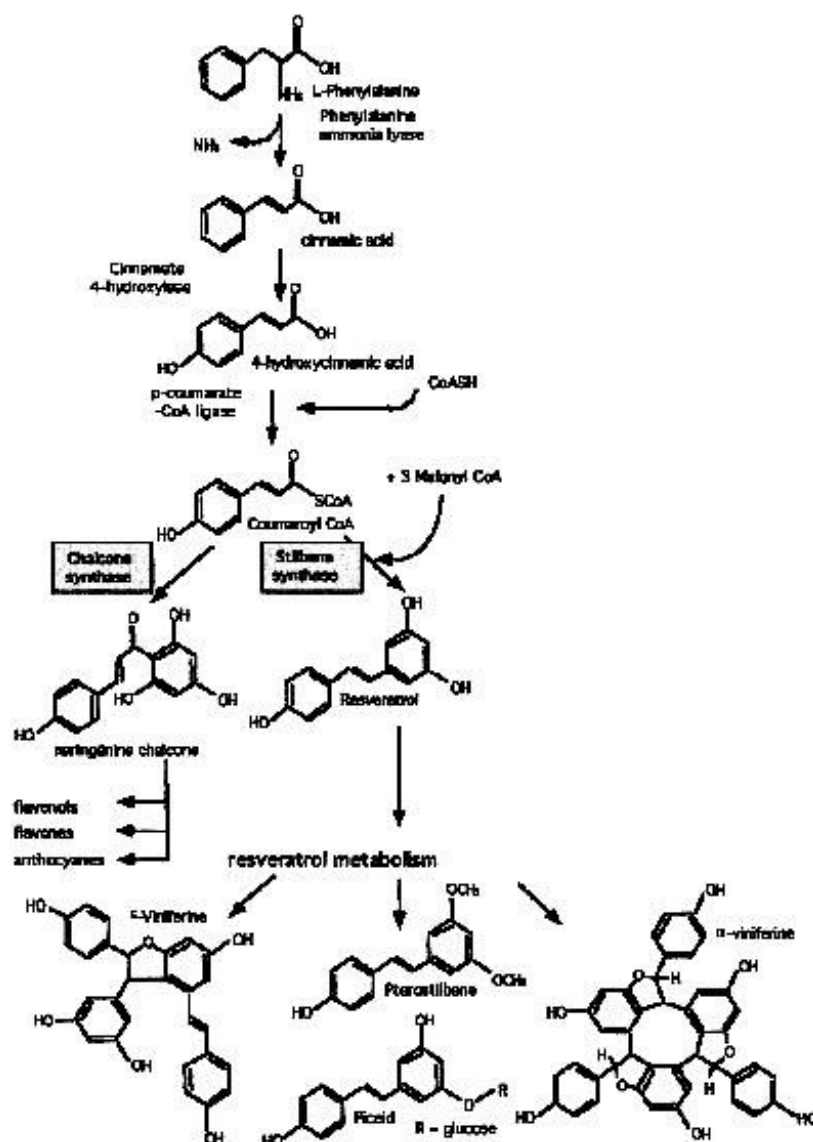
Recentemente sono stati parzialmente chiariti i meccanismi molecolari d'azione del resveratrolo. Certamente la semplicità della sua struttura chimica gli permette di interagire con una grande quantità di recettori ed enzimi (Frémont, 2000; Orallo 2006), in modo particolare coi recettori per gli estrogeni (King *et al.*, 2006), così da modulare l'espressione genica. La funzione antiossidante, in generale, sembra essere esplicata attraverso la formazione di un radicale stabile grazie alla sua struttura di risonanza che può intrappolare i radicali liberi (King *et al.*, 2006), oppure potrebbe direttamente inibire la loro generazione. Inoltre il resveratrolo attua meccanismi specifici: ad esempio è in grado di chelare il rame (catalizzatore di ossidazioni biologiche) riducendo l'ossidazione delle LDL (Frémont, 2000).

Non è ancora chiaro se tutto ciò sia valido per entrambi gli isomeri (*trans* e *cis*) del resveratrolo. La letteratura, infatti, è contraddittoria a proposito della loro possibile differenza di biodisponibilità ed effetti, e se le forme *trans* e *cis* attuino gli stessi meccanismi d'azione e se siano parimenti efficaci. Entrambe mostrano una tipica attività antiossidante a concentrazioni micromolari, ma in alcuni casi il *cis*-resveratrolo sembra essere, secondo alcuni autori, un po' meno efficiente del *trans* (Frémont, 2000; Orallo 2006). La differenza, se c'è, sembra essere più di tipo quantitativo che qualitativo: la conformazione spaziale non influirebbe sull'interazione coi potenziali target cellulari (Orallo 2006).

### **3.2 Biosintesi e reattività chimica**

Conoscere la via biosintetica (intermedi ed enzimi) di un metabolita è un passaggio fondamentale al fine di stimolarne la produzione tramite interventi mirati (Dörnenburg e Knorr, 1995).

Questo vale anche per gli stilbeni, la cui via biosintetica è abbastanza conosciuta nella parte iniziale, fino alla sintesi di resveratrolo, mentre restano ancora da chiarire i passaggi successivi che portano alla formazione dei vari composti della famiglia. Trattandosi di fitoalessine, la loro biosintesi fa parte del metabolismo secondario e la sua attività costitutiva è bassa, e viene stimolata da infezioni di microorganismi, soprattutto funghi, o da elicitori abiotici e abiotici.



**Figura 3.** Via biosintetica degli stilbeni. Tratta da Coutos-Thévenot *et al.*, 2001.

Il resveratrolo viene sintetizzato dalla via dei fenilpropanoidi iniziata dalla fenilalanina ammonio liasi (PAL, EC 4.3.1.5) a partire dall'amminoacido fenilalanina (Jeandet *et al.*, 2002). Come schematizzato in figura 3, la PAL stacca il gruppo amminico dalla fenilalanina e catalizza la formazione di un doppio legame carbonio-carbonio, producendo acido cinnamico; poi la cinnammato-4-idrossilasi lega un ossidril in posizione 4 dell'anello benzenico; segue la sostituzione dell'OH del gruppo carbossilico con un sulfidril-coenzima A ad opera della CoA ligasi; a questo punto la via biosintetica si dirama verso la formazione del resveratrolo con enzima chiave la stilbene sintasi (STS, EC 2.3.1.95) o dei flavonoidi mediante la calcone sintasi (CHS, EC 2.3.1.74) (Soleas *et al.*, 1997; Schröder, 1999; Jeandet *et al.*, 2002). L'attività della stilbene sintasi (STS) è oltre 20 volte maggiore di quella della calcone sintasi

(CHS), ma quest'ultima è costitutivamente attiva mentre la STS deve essere indotta. Una volta attivata la via, la sintesi di stilbeni generalmente prevale su quella di flavonoidi (Melchior e Kindl, 1991).

La reazione di condensazione catalizzata dalla STS utilizza 3 malonil-CoA (ottenuti da elongazione di unità di acetyl CoA) e 1 *p*-cumaroyl-CoA (dalla fenilalanina via PAL) per formare una molecola di *trans*-resveratrolo (Soleas *et al.*, 1997; Schröder, 1999; Jeandet *et al.*, 2002). Un altro stilbene analogo al resveratrolo, la pinosilvina (3,5-diidrossistilbene), è sintetizzata da una variante enzimatica della STS presente nel pino (*Pinus sylvestris*), sempre in una sola reazione ma a partire da un altro substrato al posto del cumaroyl-CoA. La struttura chimica del resveratrolo, rappresentata in figura 2, è relativamente semplice: due anelli fenolici uniti da un doppio legame tipo stirene, con ossidrili in posizione 3 e 5 di un anello e 4 dell'altro (Jeandet *et al.*, 1997; Pervaiz, 2003). Esiste nelle forme diastereoisomeriche *cis* e *trans*; l'isomerizzazione da *trans* a *cis* è favorita dall'esposizione alle radiazioni ultraviolette. La differenza nell'assorbimento massimo (*cis* a 285 nm e *trans* a 305 nm) ne permette separazione ed analisi con HPLC in colonna a fase inversa C18 (Jeandet *et al.*, 1997). Il *trans*-resveratrolo ha peso molecolare di 228 Da ed è stabile per anni se protetto da luce e pH alti, mentre la forma *cis* è meno resistente (Soleas *et al.*, 1997; Frémont, 2000).

Una volta indotta la via biosintetica, ad esempio tramite infezione di *Botrytis cinerea*, si osserva un accumulo di resveratrolo attorno all'area infettata, ma già dopo 48-72 ore l'enzima stilbene ossidasi è indotto per degradarlo (Pervaiz, 2003). Le stesse cellule che sintetizzano gli stilbeni, quindi, sono anche in grado di degradarli. Questo perché, nel tempo ed a concentrazioni elevate, gli stilbeni sono tossici anche per le stesse cellule vegetali che li producono. Inoltre, essi possono essere inattivati o degradati da alcuni funghi patogeni con particolari reazioni di dimerizzazione ossidativa, monossigenazione, demetilazione, riduzione, ossidazione o idratazione, che danno prodotti a minore tossicità (Soleas *et al.*, 1997; Jeandet *et al.*, 2002).

Essendo un polifenolo, il resveratrolo è soggetto alla gamma di reazioni chimiche tipiche di questa categoria di composti. Importante per la sua reattività è il chinone, un radicale catione che si forma nei derivati stilbenici per perdita di un ossidrile (probabilmente quello in posizione 4') e che dà luogo a reazioni di isomerizzazione, ossidazione e dimerizzazione (Jeandet *et al.*, 2002).

Gli altri stilbeni derivano dal resveratrolo principalmente attraverso due tipi di reazioni che avvengono in natura: la dimerizzazione ossidativa e la formazione di glucosidi (Jeandet *et al.*,

2002). Per dimerizzazione si ottengono le viniferine, che posseggono un potere antimicrobico molto maggiore del monomero. La glucosilazione è importante in quanto è molto comune che le piante immagazzinino metaboliti secondari inattivandoli sotto forma di glucosidi, anche se nel caso degli stilbeni le forme glucosilate associano ad una aumentata stabilità, una buona attività biologica.

Anche gli stilbeni derivati possiedono una loro reattività. Di particolare importanza sono le reazioni di isomerizzazione *cis-trans* (reversibili) e di ossidazione. In entrambi i casi si passa attraverso intermedi che sono radicali cationici e la reattività dipende dai sostituenti presenti sugli anelli fenolici (Majima *et al.*, 1996).

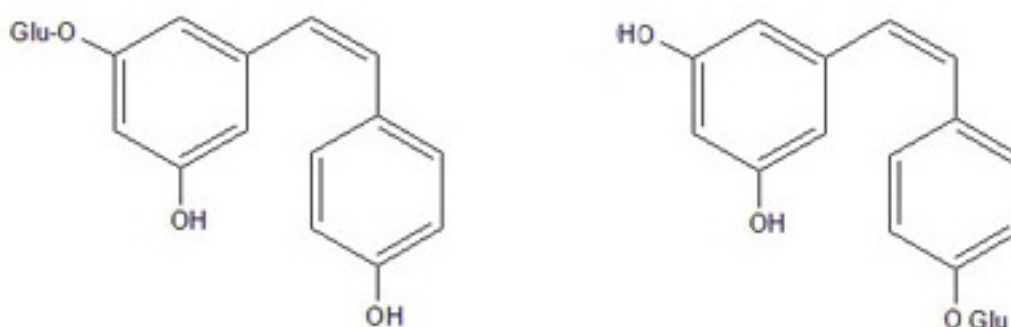
Il resveratrolo e gli altri stilbeni partecipano a reazioni biochimiche anche dopo essere stati assorbiti da organismi animali. In seguito all'ingestione, gli stilbeni attraversano il tratto gastrointestinale e sono assorbiti a livello intestinale. I derivati glucosilati subiscono subito una idrolisi dello zucchero ad opera di  $\beta$ -glucosilasi. Il resveratrolo in forma libera, nei microsomi, viene glucuronidato da enzimi UDP-glucuronil-transferasi che coniugano una molecola di acido glucuronico ad un suo ossidrile. La reazione di glucuronizzazione è regio- e stereo-specifica, cioè predilige, nell'ordine, le posizioni 3 e 4' ed avviene 5-10 volte più velocemente sul *cis*-resveratrolo rispetto al *trans* (Aumont *et al.*, 2001). Il resveratrolo è preferenzialmente assorbito in questa forma coniugata ed entra nella circolazione sanguigna. Spesso la glucuronizzazione è un meccanismo di inattivazione e di indirizzamento verso l'escrezione, ma nel caso degli stilbeni e dei flavonoidi è più probabile che sia un modo per modularne l'effetto: le forme attive possono essere liberate da  $\beta$ -glucuronidasi presenti in vari organi e tessuti (macrofagi, fegato, ecc.) (Kuhnle *et al.*, 2000; Aumont *et al.*, 2001).

### 3.3 Stilbeni monoglucosilati

Fra i derivati glucosilati del resveratrolo, il più comune è il piceide (3,5,4'-diidrossistilbene-3-O- $\beta$ -D-glucopiranoside) (Adrian *et al.*, 2000; Jeandet *et al.*, 2002), caratterizzato da un gruppo glucosio legato all'ossidrile in posizione 3 del primo anello. Altrettanto importante, anche se meno studiato, è il resveratroloside (3,5,4'-diidrossistilbene-4'-O- $\beta$ -D-glucopiranoside), che ha un glucosio in 4' sul secondo anello fenolico. Entrambi (figura 4) esistono nelle due forme isomeriche *trans* e *cis* e si formano per glicosilazione diretta del resveratrolo. Sono probabilmente gli stilbeni più comuni (Regev-Shoshani *et al.*, 2003) e sono stati osservati entrambi in colture cellulari di vite, nelle bacche dell'uva e nel vino, in quantità paragonabili a quelle del resveratrolo libero e in rapporto *cis/trans* molto variabile

(Waterhouse e Lamuela-Raventos, 1994; Waffo Teguo *et al.*, 1998; Ribeiro de Lima *et al.*, 1999; Versari *et al.*, 2001; Decendit *et al.*, 2002; Bavaresco *et al.*, 2006). Durante la maturazione dell'uva il contenuto di piceide (*trans* e *cis*) tende ad aumentare, mentre cala il *trans*-resveratrolo. Nelle bucce degli acini in maturazione il *cis*-piceide è stato identificato come lo stilbene presente in maggior quantità (Versari *et al.*, 2001). L'etanolo del vino è capace di estrarre non solo il resveratrolo in forma libera ma, subito dopo, anche le forme glucosilate (King *et al.*, 2006), le quali si possono scindere durante la fermentazione malolattica grazie all'azione di batteri con attività  $\beta$ -glucosidasi (Soleas *et al.*, 1997; Bavaresco *et al.*, 2006).

Altri stilbeni monoglucosilati della vite sono *trans*- e *cis*-astringina, 3-O- $\beta$ -glucosidi del 3'-idrossi-resveratrolo, presenti sia nell'uva che nel vino (Ribeiro de Lima *et al.*, 1999; Jeandet *et al.*, 2002).



**Figura 4.** Strutture di *cis*-piceide (3,5,4'-diidrossistilbene-3-O- $\beta$ -D-glucopiranoside), a sinistra, e *cis*-resveratroloside (3,5,4'-diidrossistilbene-4'-O- $\beta$ -D-glucopiranoside), a destra, i due principali derivati monoglucosilati del resveratrolo.

La glucosilazione è comunemente usata dalle piante per detossificare composti fitotossici (endogeni di difesa o esogeni), che sono così resi idrosolubili ed accumulati nel vacuolo o in altri compartimenti cellulari (Dörnenburg e Knorr, 1995), oppure per immagazzinare metaboliti che in forma coniugata risultano inattivi e più stabili. Nel caso del resveratrolo, la glucosilazione aumenta sì la stabilità della molecola, ma non la inattiva. Spesso, infatti, lo zucchero (o un altro sostituyente) è coniugato in una posizione che non è la più reattiva in termini di capacità antiossidante (per il resveratrolo la 4'), così l'attività è conservata almeno in parte (Regev-Shoshani *et al.*, 2003). Inoltre il legame del glucosio modifica la conformazione tridimensionale del resveratrolo (da planare a ruotato lungo il doppio legame a ponte), che viene così degradato con minor efficienza dagli enzimi ossidasici ed aumenta in

stabilità (Regev-Shoshani *et al.*, 2003). Il legame con lo zucchero, infine, aumenta la solubilità del composto nel citosol e l'affinità coi trasportatori del glucosio (Regev-Shoshani *et al.*, 2003; King *et al.*, 2006).

L'attività biologica degli stilbeni monoglucosilati è stata studiata meno di quella dell'aglicone libero, ma numerose evidenze sperimentali dimostrano che essa è simile, anche se spesso minore, a quella del resveratrolo e sembra essere strettamente correlata al tipo e alla posizione dei sostituenti e alla conformazione *cis/trans* (Orsini *et al.*, 1997; Frémont, 2000; Regev-Shoshani *et al.*, 2003). Comunque dopo l'ingestione, il primo passaggio dell'assorbimento degli stilbeni glucosilati è l'idrolisi dello zucchero da parte di glicosidasi (lattasi, florizina idrolasi (LPH, legata alla membrana plasmatica sul lato luminale) e  $\beta$ -glucosidasi citosolica (CBG)) presenti nel tratto gastrointestinale umano (Aumont *et al.*, 2001; Henry-Vitrac *et al.*, 2006). Dopo la deglucosilazione, l'aglicone è metabolizzato a *trans*-resveratrolo-3-O- $\beta$ -glucuronide (e in misura minore sulla posizione 4') o viene coniugato con un gruppo solfato nei microsomi di intestino e fegato, così come avviene per il resveratrolo ingerito in forma libera (Henry-Vitrac *et al.*, 2006).

### **3.4 Stilbene sintasi e calcene sintasi**

La stilbene sintasi (STS, EC 2.3.1.95) è l'enzima terminale nella formazione del resveratrolo e si pone alla diramazione della via biosintetica fra la produzione di stilbeni e quella di flavonoidi operata dalla calcene sintasi (CHS, EC 2.3.1.74). La CHS è ubiquitaria nelle piante superiori ed è costitutivamente espressa ed attiva, mentre la STS è presente solo in determinate specie ed è inducibile (Austin *et al.*, 2004). Una volta che è stata attivata, l'attività della STS è oltre 20 volte maggiore dell'attività della CHS, quindi la sintesi di stilbeni prevale su quella dei flavonoidi (Melchior e Kindl, 1991). In condizioni normali vi è una espressione basale costitutiva della STS, ad esempio nelle parti legnose della vite dove potrebbe avere un ruolo nella resistenza del legno alla decomposizione (Bavaresco *et al.*, 2003), ma l'espressione è spesso aumentata in risposta a stimoli biotici o abiotici (Langcake e Pryce, 1976; Melchior e Kindl, 1991; Adrian *et al.*, 1996; Schubert *et al.*, 1997; Adrian *et al.*, 2000; Jeandet *et al.*, 2002; Commun *et al.*, 2003). Ogni specie di pianta modula il grado di espressione del trascritto ed il tempo e tipo di risposta in relazione allo stimolo elicitore, allo stadio di sviluppo delle singole cellule vegetali interessate e a numerosi altri fattori. In generale, comunque, l'induzione della sintesi di stilbeni, e quindi l'espressione genica della stilbene sintasi, è un processo rapido che viene attuato in poche ore (Melchior e Kindl, 1991).

A livello trascrizionale è stato osservato come l'accumulo di mRNA dell'enzima STS avvenga in due ondate successive: questi 2 picchi potrebbero corrispondere ad almeno 2 diversi gruppi di geni di stilbene sintasi (isoforme geniche), l'uno espresso precocemente ma con rapida degradazione degli mRNA prodotti, l'altro espresso più tardi, con lenta attivazione, ma con mRNA più stabili (Soleas *et al.*, 1997; Jeandet *et al.*, 2002). La stilbene sintasi, infatti, è codificata da una famiglia multigenica con almeno 15-20 isoforme isolate dalla vite (*Vitis vinifera*), forse atte a rispondere a stimoli esterni diversi (Melchior e Kindl, 1991; Sparvoli *et al.*, 1994; Goodwin *et al.*, 2000; Jeandet *et al.*, 2002; Commun *et al.*, 2003). La STS appartiene alla superfamiglia degli enzimi polichetide sintasi (PKS) di tipo III, caratterizzati da una struttura omodimerica e dalla triade catalitica Cys-His-Asn nel sito attivo, ed in particolare alla famiglia CHS-like (Ferrer *et al.*, 1999; Schröder, 1999; Austin *et al.*, 2004; Shomura *et al.*, 2005). Probabilmente la STS si è evoluta indipendentemente in diverse piante tramite duplicazione genica e divergenza dalla CHS (Goodwin *et al.*, 2000; Austin *et al.*, 2004). Le sequenze geniche dei due enzimi, infatti, hanno oltre il 70 % di identità, senza significative delezioni o inserzioni, entrambe con un unico introne omologo e nella stessa posizione (Schröder *et al.*, 1988; Goodwin *et al.*, 2000; Shomura *et al.*, 2005).

Sono state studiate le cinetiche di espressione e di attività enzimatica della STS e si è visto che non coincidono esattamente (Melchior e Kindl, 1991).

STS e CHS sono enzimi che utilizzano gli stessi substrati (un cumaroil-CoA e 3 malonil-CoA) e catalizzano 3 reazioni di ciclizzazione/condensazione analoghe, ma portano alla formazione di due prodotti diversi (Schröder *et al.*, 1988; Soleas *et al.*, 1997; Ferrer *et al.*, 1999; Schröder, 1999; Jeandet *et al.*, 2002; Austin *et al.*, 2004; Shomura *et al.*, 2005): la STS sintetizza il resveratrolo (3,5,4'-triidrossistilbene), da cui derivano gli stilbeni, la CHS produce calcone (4,2',4',6'-tetraidrossicalcone), da cui si ha la formazione dei flavonoidi. La reazione catalizzata dai due enzimi è molto simile ma l'ultimo passaggio è leggermente diverso: un intermedio polichetide comune viene piegato ad assumere una diversa conformazione spaziale che determinerà il prodotto differente, quindi la specificità è data dalla stereochimica della reazione (Ferrer *et al.*, 1999; Schröder, 1999; Austin *et al.*, 2004). Inoltre la STS libera 4 molecole di CO<sub>2</sub>, mentre la CHS solo 3 (Soleas *et al.*, 1997).

Negli ultimi anni sono stati ottenuti i cristalli della CHS di *Medicago sativa* (erba medica) (Ferrer *et al.*, 1999), della STS di *Pinus sylvestris* (pino, che sintetizza la pinosilvina, 3,5-diidrossistilbene) (Austin *et al.*, 2004) e della STS da *Arachis hypogaea* (arachide, che sintetizza resveratrolo) (Shomura *et al.*, 2005). La risoluzione della struttura 3D di questi



enzimi, in presenza di vari substrati e prodotti, ha permesso, fra l'altro, di capire maggiori dettagli del meccanismo di reazione. Sono tutte e tre proteine di circa 400 amminoacidi con una omologia di sequenza del 70-90 % fra STS di specie diverse e fra STS e CHS (Ferrer *et al.*, 1999; Schröder, 1999; Austin *et al.*, 2004). Sono omodimeri simmetrici; ogni monomero è 42-43 kDa ed è formato da due domini strutturali, il superiore con un motivo pseudosimmetrico  $\alpha\beta\alpha\beta$ , e l'inferiore che ha un suo sito attivo funzionalmente indipendente (anche se sembra utilizzare il residuo di Met 137 dell'altro monomero) (Ferrer *et al.*, 1999; Schröder, 1999; Austin *et al.*, 2004; Shomura *et al.*, 2005). Il sito attivo è altamente conservato fra CHS e STS sia in sequenza amminoacidica che in configurazione spaziale: vi sono 4 residui altamente conservati Cys 164 (centro nucleofilo), Phe 215 (per decarbossilazione), His 303 (base generale), Asn 336 (per decarbossilazione) e 3 cavità strutturali per i substrati (Ferrer *et al.*, 1999; Jeandet *et al.*, 2002). Le piccole differenze presenti nel sito attivo da sole non sembrano giustificare la diversità di reazione (Austin *et al.*, 2004). Infatti è stato dimostrato che in determinate condizioni STS e CHS possono sintetizzare l'uno il prodotto dell'altro (Jeandet *et al.*, 2002). Vi sono, però, differenze comuni tra le STS e la CHS nella conformazione locale attorno al sito attivo (Shomura *et al.*, 2005). La specificità di STS per il substrato (e quindi per il prodotto) cambia con la specie e sembra essere determinata da singoli amminoacidi; ad esempio vi è una coppia istidina-glutamina che nella vite è in sequenza His-Gln e permette di legare p-cumaroil-CoA per la formazione di resveratrolo, mentre nel pino è invertita in Gln-His dove utilizzando cinnamoil-CoA si ottiene la pinosilvina (Jeandet *et al.*, 2002). Inoltre si osservano alcune diversità nella struttura terziaria di STS di specie diverse (Shomura *et al.*, 2005).

#### **4. ALTRI POLIFENOLI VEGETALI**

I polifenoli vegetali, fra cui stilbeni e flavonoidi, sono componenti essenziali della dieta umana e costituiscono il gruppo più abbondante di metaboliti secondari. Sono composti aromatici con numerosi gruppi ossidrilici legati agli anelli benzenici, grazie ai quali esplicano una forte funzione antiossidante. La famiglia più vasta è quella dei fenilpropanoidi, metaboliti secondari molto diversificati derivati dalla fenilalanina via PAL, con cui la pianta si difende da patogeni e da variazioni ambientali e che hanno effetti nutraceutici e farmaconutrienti (Iriti e Faoro, 2004).

Attraverso la dieta, molti polifenoli vegetali entrano nell'organismo umano. Nella pianta la maggioranza dei polifenoli non è libera ma sono sottoforma di glucosidi o metossidi o sono legati a catene di acidi grassi. La glucosilazione, in particolare, li protegge dall'ossidazione enzimatica mantenendo la capacità antiossidante e le proprietà biologiche (Regev-Shoshani *et al.*, 2003). Le forme coniugate sono di norma conservate negli alimenti e giungono nell'intestino umano (Németh *et al.*, 2003; Iriti e Faoro, 2004). La deglucosilazione è, quindi, la prima fase dell'assorbimento dei polifenoli che, dopo essere entrati nelle cellule per diffusione passiva o con trasportatori, vengono coniugati con glucuronidi o solfati (Németh *et al.*, 2003; Henry-Vitrac *et al.*, 2006), così come avviene per gli stilbeni. Alcuni polifenoli, ad esempio la rutina (il flavonoide più abbondante nel tè), non sono un substrato riconosciuto dalle  $\beta$ -glucosidasi intestinali, quindi proseguono lungo il tratto digerente fino al colon, dove sono processati dalla microflora ed assorbiti (Németh *et al.*, 2003). L'assorbimento di questi composti dipende anche dalle variazioni individuali dell'attività degli enzimi coinvolti (Németh *et al.*, 2003) e dalla interazione con gli altri alimenti assunti, ad esempio le proteine del latte ne riducono la biodisponibilità (Dixon *et al.*, 2005).

Numerosi studi hanno indagato presenza ed effetti dei polifenoli nel vino. Fra le sostanze fenoliche contenute nella bevanda vi sono antocianine, catechine, stilbeni e tannini condensati, che le conferiscono le potenti proprietà antiossidanti grazie alle quali si è trovata risposta al Paradosso Francese (Decendit e Mérillion, 1996). Le vie biosintetiche di queste classi di molecole sono strettamente correlate fra loro e quindi sono influenzate dagli stessi fattori anche se con tempi diversi (Decendit e Mérillion, 1996). Ad esempio, di 4 molecole contenute in buona quantità nei vini rossi (*trans*-resveratrolo, quercetina, catechina, acido gallico) sono stati confrontati la concentrazione media, la percentuale assorbita dall'intestino ed il potere antitumorale in topo, e si è concluso che i 3 parametri devono essere combinati per individuare il composto più efficace, che è risultato essere il *trans*-resveratrolo (meno efficace in vitro della quercetina ma assorbito 20 volte meglio, nonostante catechina ed acido gallico siano mediamente più concentrati nel vino) (Soleas *et al.*, 2002).

Le industrie farmaceutica, alimentare e cosmetica negli ultimi anni si sono rivolte a queste molecole naturali per le loro promettenti caratteristiche e questo interesse si è tradotto in una nuova spinta per la ricerca. In particolare ci si è rivolti verso composti vegetali che hanno mostrato di possedere proprietà antiossidanti. Per antiossidante si intende una sostanza capace di ritardare o bloccare il processo di ossidazione, dannoso sotto molti punti di vista. Di norma si distinguono in ritardanti (captatori di radicali liberi) e decompositori di perossidi, composti che sono i principali responsabili dell'ossidazione.

Fra i principali antiossidanti vegetali vi sono i polifenoli, di cui i più studiati sono i flavonoidi e diverse fitoalessine, che trovano uso in svariati ambiti. Oltre che in campo medico, sono industrialmente usati, ad esempio, addizionati a molti cibi per impedirne l'alterazione del sapore e del colore. Alcune fitoalessine trovano impiego in campo agrario come pesticidi naturali.

#### **4.1 Flavonoidi**

I flavonoidi sono composti aromatici in genere colorati che hanno, fra le altre, proprietà antiossidanti (Whitehead *et al.*, 1995). Queste molecole sono polifenoli ubiquitari in natura e sono suddivisi, a seconda della struttura chimica, in calconi, flavoni, flavonoli, flavandioli, antociani e tannini condensati, più gli auron (diffusi ma non ubiquitari) e gli isoflavoni (nei legumi e in poche altre piante) (Winkel-Shirley, 2001a). Sono stati identificati più di 5000 flavonoidi, molti dei quali si trovano in alimenti vegetali quali frutta, verdura e bevande (tè verde, caffè, birra chiara, vino rosso e succhi di frutta) (Iriti e Faoro, 2004). Nelle piante e negli alimenti sono presenti quasi solo in forma  $\beta$ -glucosilata, ma nel sistema circolatorio umano li si ritrova glucuronizzati, sulfurilati o metilati, quindi subiscono un processamento a più fasi durante l'assorbimento (Németh *et al.*, 2003; Iriti e Faoro, 2004). La quantità di flavonoidi assunta tramite l'alimentazione è abbastanza elevata in confronto ad altri antiossidanti presenti nella dieta, come la vitamina C, la vitamina E, il selenio ed i carotenoidi, nonostante la loro biodisponibilità sia solo parziale (la quantità ingerita viene assorbita fra 0,2 e 20%) (Iriti e Faoro, 2004). Recentemente queste molecole hanno riscosso molto interesse per i loro potenziali effetti benefici sulla salute umana: hanno proprietà antivirali, antiallergiche, antiinfiammatorie ed antitumorali; sembrano prevenire malattie coronariche, ictus, tumori ed osteoporosi; proteggono le macromolecole cellulari (lipidi, DNA, proteine) dai danni ossidativi. Sono in grado di attuare tutti questi effetti agendo su espressione genica e trasduzione del segnale e grazie ad azioni antiossidanti dirette (Németh *et al.*, 2003). Fra i principali flavonoidi ad azione antiossidante si può ricordare la quercetina (2-[3,4-diidrossifenil]-3,5,7-triidrossi-4H-1-benzopiran-4-one), probabilmente quello più abbondante nella dieta umana nonostante il suo tasso di assorbimento intestinale non sia ottimale. Si tratta di un flavonolo presente nel tè nero, nella verdura, nella buccia dei frutti e nella cipolla, avente un ampio spettro di attività antitumorali e su cui sono già in corso sperimentazioni cliniche sull'uomo (Soleas *et al.*, 2002).

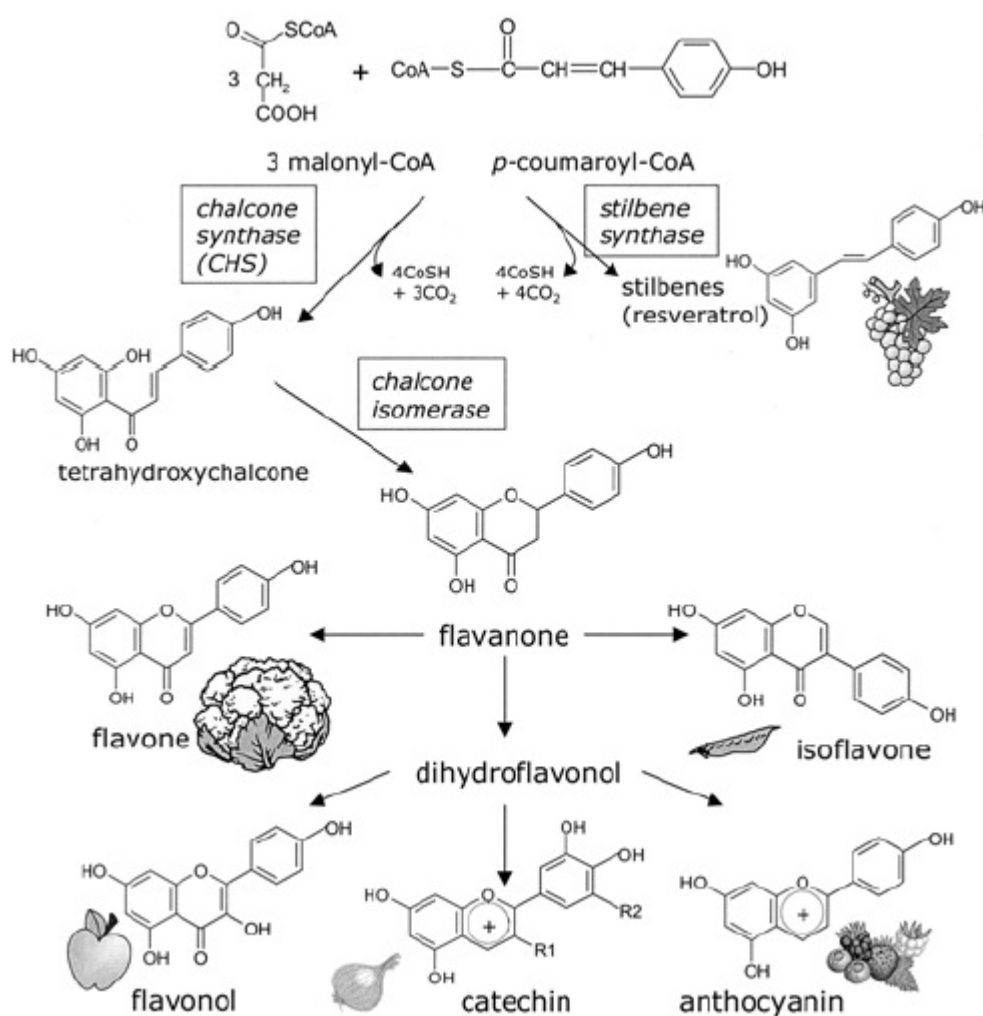
L'attività antiossidante dei flavonoidi dipende dalla loro struttura molecolare, in particolare da numero e posizione dei gruppi idrossilici. Anche la presenza del gruppo prenilico ha un ruolo fondamentale, al punto che flavonoidi che ne sono privi agiscono da pro-ossidanti ma l'aggiunta di un prenilico è sufficiente a controbattere la loro attività pro-ossidante (ne è un esempio la naringenina degli agrumi).

Le piante sintetizzano i flavonoidi non solo per contrastare lo stress ossidativo, ma anche perché sono composti colorati. In fiori e frutti determinano colori chiari (bianco/giallo/beige) o rosso/blu, secondo la loro struttura chimica. Oltre che nel visibile possono emettere nell'ultravioletto e quindi sono individuati dagli insetti impollinatori. Svolgono anche funzioni nelle segnalazioni fra pianta e microorganismi, nella fertilità maschile, nella difesa da microorganismi ed erbivori, nella protezione dalle radiazioni ultraviolette, nella formazione dei noduli radicali per la fissazione dell'azoto, nella vitalità del polline (Sparvoli *et al.*, 1994; Winkel-Shirley, 2001a; Iriti e Faoro, 2004).

Vi sono flavonoidi costitutivamente espressi nelle cellule vegetali differenziate ed altri la cui produzione avviene od aumenta al bisogno; taluni sono regolati in modo dipendente dallo sviluppo o tessuto-specifico e talaltri sono indotti da stimoli ambientali. Specie vegetali diverse sintetizzano ed accumulano tipi di flavonoidi differenti ma strutturalmente e funzionalmente simili; alcuni sono molto specializzati e specie-specifici. La via centrale del metabolismo dei flavonoidi è altamente conservata, ma ci sono divergenze importanti nei ruoli funzionali dei prodotti finali e nei modi di controllo dell'espressione della via stessa. Forse i geni della biosintesi dei flavonoidi si sono evoluti a partire da geni di metabolismi primari, con duplicazione genica che ha portato all'adattamento degli enzimi per funzioni specializzate. In molte piante, i primi enzimi della via biosintetica sono codificati da famiglie multi geniche (ad esempio PAL e CHS), mentre i successivi sono presenti in 1-4 isoforme (Sparvoli *et al.*, 1994; Winkel-Shirley, 2001b).

La biosintesi dei flavonoidi avviene tramite la via dei fenilpropanoidi che parte dalla fenilalanina e conduce, dopo numerose ed articolate reazioni enzimatiche, alla produzione delle varie sottofamiglie di composti (figura 5) (Winkel-Shirley, 2001a; Iriti e Faoro, 2004). Il primo enzima della via metabolica è la fenilalanina-ammonio liasi (PAL). Dopo pochi passaggi, dai quali partono altre diramazioni metaboliche per la sintesi, fra l'altro, di lignina e tannini, la via si biforca. Questo passaggio chiave è la condensazione di un acido cumarico e 3 malonil-CoA catalizzata da un lato dalla stilbene sintasi (STS), che sintetizza il resveratrolo da cui derivano gli stilbeni (vedi [paragrafo 3.2](#)), e dall'altro dalla calcione sintasi (CHS) che forma il calcione (figura 6), il primo flavonoide. La calcione isomerasi (CHI) chiude un anello

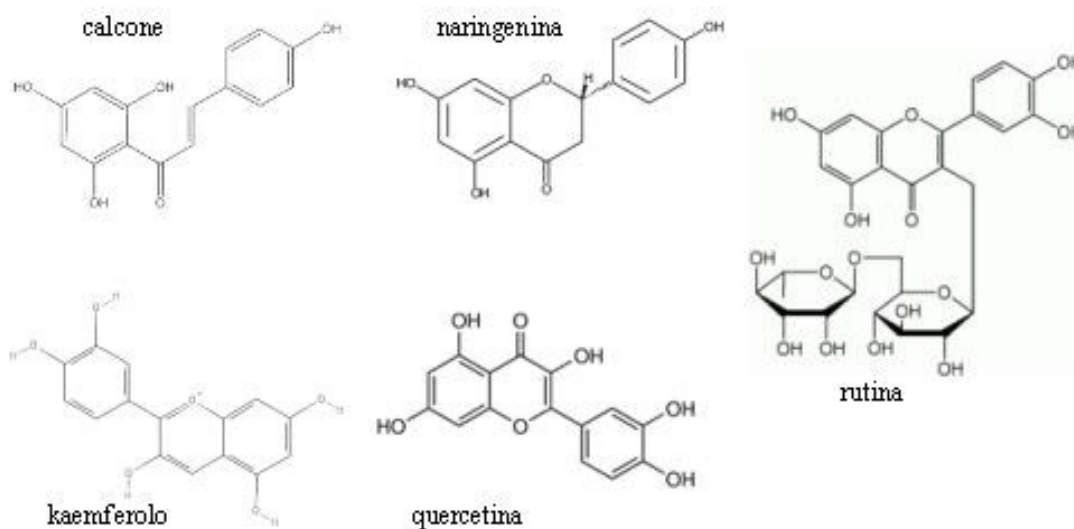
e genera la naringenina (figura 6), un flavanone particolarmente abbondante negli agrumi. La via metabolica successiva è ricca di diramazioni interconnesse fra loro. Da un lato viene sintetizzato il kaemferolo (o miricetina). Da un'altra parte si passa per un altro composto chiave, la quercetina (un flavonolo), a cui segue la famiglia delle catechine. Da un terzo lato si ottiene la biosintesi di antocianine e antociani. Ma anche dalle catechine possono derivare altri antociani (e viceversa), a riprova del fatto che la struttura metabolica è estremamente complessa e dinamica. Dalla quercetina, per glucosilazione, deriva anche un altro flavonoide importante per l'uomo, la rutina (quercetina-3-rutinoside) o vitamina P. Le strutture di alcuni fra i flavonoidi più importanti sono rappresentate in figura 6.



**Figura 5.** Semplificazione schematica della via biosintetica delle principali famiglie di flavonoidi. Tratto da Iriti e Faoro, 2004.

Gli enzimi della biosintesi e del metabolismo dei flavonoidi e, più in generale, dei fenilpropanoidi sono stati ipotizzati formare complessi multienzimatici atti a facilitare il trasferimento degli intermedi (channeling): PAL, CHS ed altre proteine coinvolte sembrano

essere colocalizzate in blanda associazione con la faccia citosolica del reticolo endoplasmatico rugoso. La biosintesi avviene, quindi, nel citoplasma, poi vi è un sistema di trasporto verso il vacuolo o la parete cellulare (Winkel-Shirley, 2001a e 2001b).



**Figura 6.** Strutture di alcuni fra i flavonoidi più importanti.

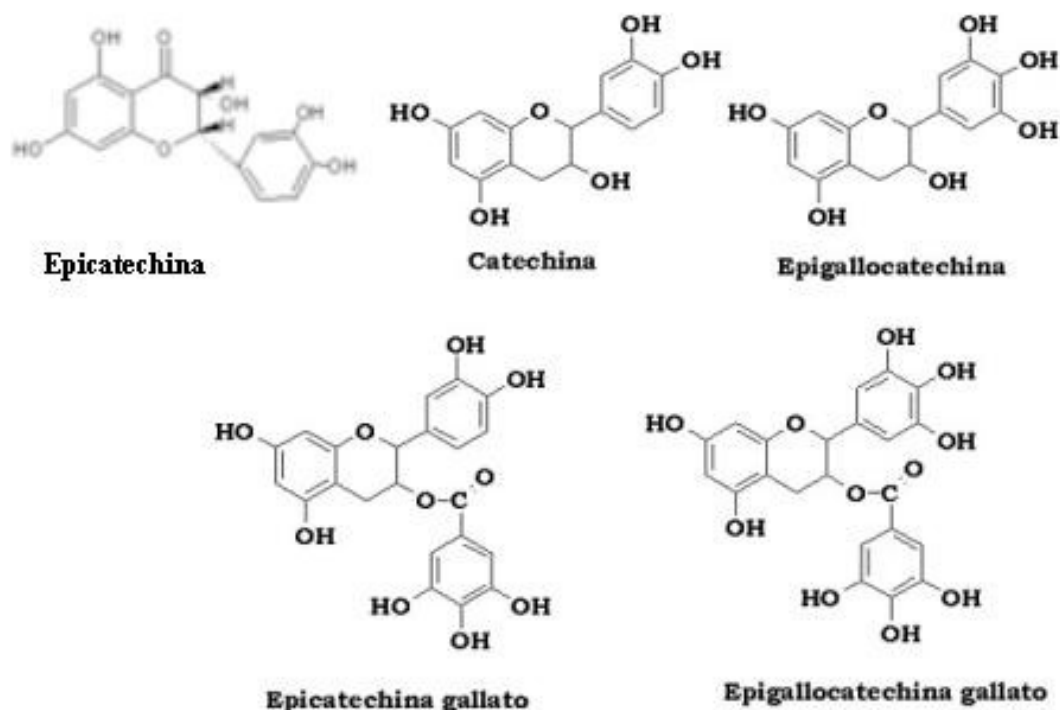
## 4.2 Catechine

Una sottofamiglia di flavonoidi particolarmente importante è quella delle catechine (o flavani o flavan-3-oli). Frutta e verdura ne sono ricche e sono largamente presenti anche nel vino rosso e nella cioccolata. Sono i polifenoli più abbondanti nel tè verde che viene considerato una “bevanda antitumorale” (Soleas *et al.*, 2002).

Assumono colorazioni fra il giallo, il rosso e il marrone così, ad esempio sono responsabili del colore ambrato del vino. Essendo i precursori dei tannini complessi (Dixon *et al.*, 2005), nel vino devono essere stabilizzate per non aumentare eccessivamente la sensazione astringente.

Le catechine sono antiossidanti, hanno proprietà benefiche per il cuore ed il sistema cardiocircolatorio, sono in grado di inibire la crescita tumorale e anche di prevenirne l’iniziazione (Soleas *et al.*, 2002; Dixon *et al.*, 2005).

Le catechine sono sintetizzate a valle della PAL e della CHS, a partire da diidroquercetina ed in molti casi vengono esterificate con acido gallico (ad esempio epicatechina-gallata, epigallo catechina, epigallo catechina-gallata). La struttura di alcune catechine è rappresentata in figura 7.



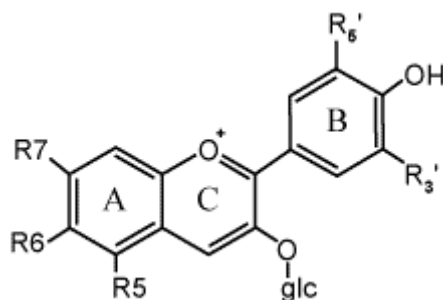
**Figura 7.** Struttura di alcune catechine.

### 4.3 Antociani

Gli antociani sono flavonoidi propri delle sole piante superiori, di colore variabile dal rosso al violetto all'azzurro a seconda del pH del mezzo in cui si trovano, della eventuale formazione di sali con metalli pesanti e dei gruppi ossidrilici e metilici presenti (Iriti e Faoro, 2004). Diversamente miscelati danno luogo a differenti colorazioni e sfumature: sono infatti responsabili della pigmentazione di diversi fiori e frutti, come viole del pensiero, petunie e prugne, e del vino rosso (Soleas *et al.*, 1997). Nel vino, gli antociani contribuiscono al colore rosso e alla sensazione astringente e sono importanti nei processi fermentativi.

Strutturalmente sono glucosidi, i cui agliconi (le sostanze non zuccherine che costituiscono parte della molecola dei glucosidi) hanno la struttura fondamentale dei sali di pirilio e sono detti antocianidine (o antocianine) (figura 8) (Iriti e Faoro, 2004). Queste ultime sono un'altra classe di flavonoidi ad azione antiossidante in grado di proteggere organismi vegetali ed animali, grazie al fatto che possiedono alcuni degli effetti fisiologici più forti dei composti vegetali.

Oltre che per la funzione vessillare (cioè di attrazione per gli impollinatori) e antiossidante, gli antociani servono alle piante per proteggersi dai raggi ultravioletti, soprattutto nei germogli dove la produzione di clorofilla non è ancora cominciata.



**Figura 8.** Struttura base di antocianine (agliconi) e antociani (glucosidi). L'anello C centrale è in forma cationica ed è chiamato ione pirilio.

#### 4.4 Tannini

I tannini sono composti polifenolici (alcoli aromatici) con strutture molto complesse e pesi molecolari compresi fra 500 e 3000 Da. Sono comuni in frutti, corteccia, foglie e semi di molte piante (Dixon *et al.*, 2005) e sono particolarmente abbondanti associati ai tessuti legnosi delle angiosperme, come le cortecce di quercia, castagno, abete e acacia. Sono stati osservati anche in colture di cellule vegetali, ad esempio in sospensioni cellulari di vite (Decendit e Mérillon, 1996).

Chimicamente i tannini sono oligomeri e polimeri prodotti alla fine della via dei flavonoidi. Derivano da unità di catechina ed epicatechina (e in misura minore anche da altre catechine e forse persino dal resveratrolo (Soleas *et al.*, 1997)) e se vengono scaldati in ambiente acido si idrolizzano in antociani e antocianine colorate. Le catechine sono sintetizzate nel citoplasma ma i tannini sono accumulati nel vacuolo: la polimerizzazione ed il trasporto sono tappe intermedie fondamentali tutt'ora oggetto di studio (Dixon *et al.*, 2005).

Le caratteristiche dei vari tannini sono date dalla stereochimica dei legami che uniscono i monomeri (ad esempio *cis* o *trans*), dal grado di polimerizzazione, dallo schema di idrossilazione e dalla eventuale presenza di modificazioni (ad esempio esterificazioni) (Dixon *et al.*, 2005).

In generale, comunque, si individuano 3 classi di tannini, distinte dal percorso biosintetico di formazione e dalla stereochimica: tannini idrolizzabili (che possono generare cataboliti tossici), tannini condensati (i più comuni negli alimenti, spesso con effetti benefici) e florotannini (identificati recentemente in molte specie di alghe brune, contengono alogeni).

All'interno della cellula vegetale i tannini sono compartimentati nel vacuolo, ma quando avviene una lesione (ad esempio in seguito al morso di un predatore) la reazione tanninica

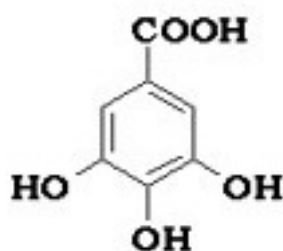


può rendere meno assimilabile la pianta. Oltre che nei sistemi di difesa da patogeni, insetti ed erbivori, i tannini hanno un ruolo nella pianta in quanto composti colorati (Dixon *et al.*, 2005).

L'uomo li utilizza da secoli per la concia delle pelli, sfruttando la loro capacità di combinarsi con le proteine della pelle animale in complessi insolubili e di prevenirne la putrefazione da parte degli enzimi proteolitici. Questa capacità di legarsi ai composti contenenti azoto (principalmente proteine ed alcaloidi) li porta a far precipitare le proteine della saliva, dando così la tipica sensazione di astringenza di molti vini rossi (Soleas *et al.*, 1997; Dixon *et al.*, 2005). I tannini presenti nell'uva sono dei tannini condensati (o proantocianidine) e sono maggiormente presenti nelle bucce e nelle vinacce: pertanto si ritrovano nei vini rossi nell'ordine di grandezza dei mg/L e sono 20 volte più concentrati che nei bianchi (Dixon *et al.*, 2005). Con l'invecchiamento del vino si ossidano, preservando il vino, e passano dal colore giallo al rosso bruno.

Una volta assunti dall'uomo con la dieta, i tannini si combinano in modo aspecifico con le proteine alimentari, formando complessi resistenti alle proteasi gastrointestinali, ed inibiscono gli enzimi digestivi. Inoltre, se assunti in dosi elevate, interferiscono con l'assorbimento del ferro e dello zinco (complessano i metalli) e anche di alcune vitamine. I tannini condensati sono fortemente antiossidanti, hanno un effetto antibatterico ed antifungino, sono antidiarroici, antiinfiammatori, immunomodulatori, vasocostrittori e sono usati nella rigenerazione dei tessuti affetti da piccole ferite e ustioni. Hanno azione positiva sul sistema cardiovascolare e nella prevenzione dell'arteriosclerosi e di alcuni tumori (Dixon *et al.*, 2005). Effetti analoghi sono stati osservati anche sui ruminanti, quindi è importante la dose di tannini presente nel foraggio perché influisce sul sapore e sulla digestione (ad esempio sono utili per ridurre la formazione di metano nel rumine e per aumentare l'assimilazione degli amminoacidi) (Dixon *et al.*, 2005).

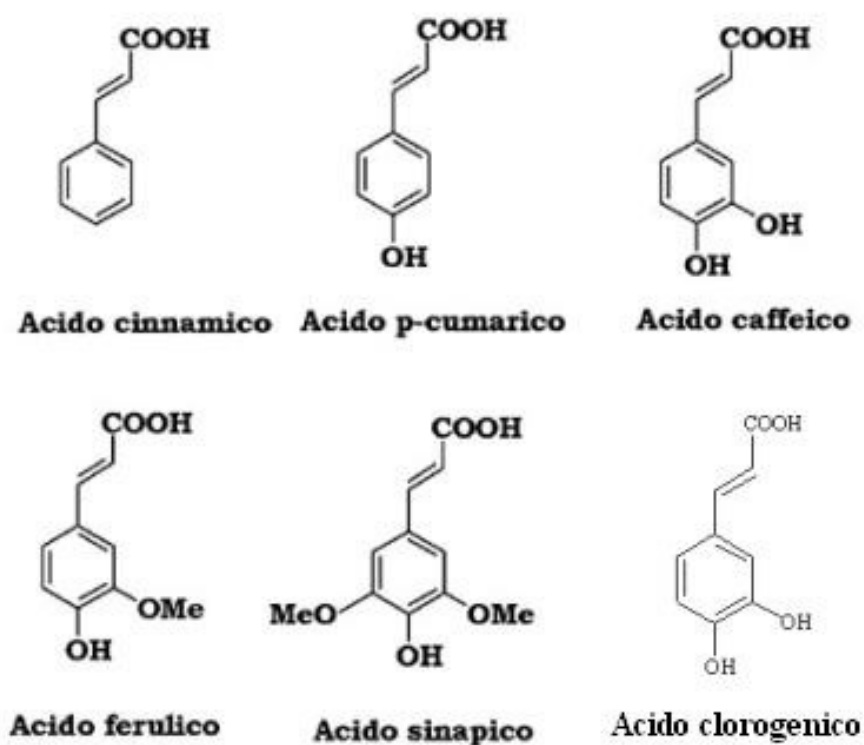
Alla base di molti tannini c'è l'acido gallico (acido 3,4,5-triidrossibenzoico) (figura 9). Il suo nome ha origine dalle "galle", escrescenze che si formano sulle foglie o sui rami dei vegetali, dovute alla parassitosi di funghi, batteri, insetti o acari. L'acido gallico è prodotto dalla pianta per combattere la proliferazione cellulare. Oltre a trovarsi nelle foglie e nelle radici di alcune piante, si trova anche nei semi e nei frutti, ed è per questo uno dei polifenoli contenuti nell'olio d'oliva, nel vino e nel tè verde. Nel vino, in particolare, è coresponsabile di colore e sapore. Spesso lo si trova coniugato alle catechine o ai tannini in forma di estere. Sull'uomo ha effetti antiossidanti, antiemorragici e antitumorali. Viene aggiunto a vari alimenti con la funzione di additivo antiossidante (Soleas *et al.*, 2002).



**Figura 9.** Struttura dell'acido gallico.

#### 4.5 Acidi idrossicinnamici

Gli acidi idrossicinnamici sono fenilpropanoidi in quanto derivano dalla fenilalanina, ma non appartengono alla famiglia dei flavonoidi perché la loro via di biosintesi si dirama a monte del calcone. La PAL deammina la fenilalanina e forma acido cinnamico, da cui derivano gli acidi idrossicinnamici. L'enzima cinnamato-4-idrolasi catalizza l'idrossilazione dell'acido cinnamico per dare acido *p*-cumarico, il quale a sua volta può essere idrossilato e metilato per formare, in sequenza, acido caffeico, acido ferulico e acido sinapico. L'acido caffeico può essere esterificato con acido quinico per ottenere l'acido clorogenico (Iriti e Faoro, 2004) (figura 10).

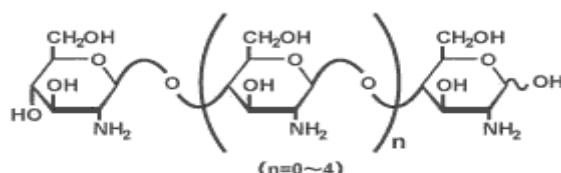


**Figura 10.** struttura dei principali acidi idrossicinnamici.

Sono composti quasi ubiquitari nel regno vegetale e svolgono principalmente attività antiossidante, sia nelle piante sia negli animali che se ne cibano. Sono presenti nel caffè, nel tè verde e nero, in frutta, verdura, legumi e cereali. In animali che se ne nutrono per lunghi periodi, gli acidi idrossicinnamici sono in grado di sequestrare i radicali liberi prevenendo, ad esempio, l'ossidazione delle LDL e proteggendo da malattie degenerative (Iriti e Faoro, 2004).

## 5. CHITOSANO

Il chitosano è un polimero lineare di D-(1,4)-glucosammina (figura 11), prodotto per deacetilazione della chitina, ed è un importante componente strutturale della parete cellulare di numerosi funghi fitopatogeni (Hadwiger, 1999).



**Figura 11.** Struttura del chitosano.

Il chitosano può essere utilizzato sia *in vitro* che *in vivo* come agente antimicrobico contro funghi, batteri e virus e come elicitore dei meccanismi di difesa delle piante (Hadwiger, 1999; Rabea *et al.*, 2003). Trova quindi applicazioni in agricoltura, tanto che dagli anni '90 è stato approvato dalla Food and Drug Administration americana per il trattamento antifungino dei semi di frumento (Hadwiger, 1999).

Il fatto che il chitosano sia biocompatibile, biodegradabile, poco costoso e atossico gli ha permesso di trovare applicazioni anche in molti altri ambiti. Ad esempio viene utilizzato come agente flocculante nel trattamento delle acque reflue, come additivo in alcuni alimenti (conservante antifungino, addensante), come agente idratante per cosmetici, come materia prima per fare pellicole semipermeabili utili per avvolgere i cibi o per applicazioni biomediche (ad esempio cerotti a rilascio controllato del farmaco) (Rabea *et al.*, 2003).

Appare evidente come molte di queste applicazioni implicino una ingestione del chitosano da parte dell'uomo. Sono stati perciò saggiati anche i suoi effetti sulla salute e si è appurato come essi siano benefici (Gallaher *et al.*, 2002). Il chitosano agisce come regolatore dell'assorbimento del colesterolo: se assunto con la dieta fa calare i livelli plasmatici di

colesterolo, così da ridurre il rischio di arteriosclerosi e delle malattie cardiovascolari in generale. Infatti non è digerito dagli animali ma passa intatto l'intestino dove, essendo un policatione, lega gli acidi biliari formando un gel in cui si emulsionano i grassi, così da limitarne l'assorbimento e favorirne l'escrezione fecale. Nello stesso modo riduce l'assorbimento dei grassi e accelera la perdita di peso, ma solo se l'assunzione di chitosano è associata ad una dieta ipocalorica (Gallaher *et al.*, 2002).

Il chitosano in qualità di elicitore biotico è efficace nell'induzione di varie reazioni di difesa della pianta, quali produzione di fitoalessine, formazione di callosio e lignina, sintesi delle proteine pathogenesis-related (PR) e di enzimi di difesa (quali PAL e perossidasi) (Hadwiger, 1999; Bézier *et al.*, 2002; Ndimba *et al.*, 2003; Kim *et al.*, 2005). Sembra che enzimi di parete della cellula vegetale scindano il chitosano presente nella parete del patogeno in oligomeri attivi. Il successivo meccanismo di azione del chitosano è ancora in parte sconosciuto, ma differenti ipotesi sono state proposte. Il chitosano, essendo un policatione, potrebbe legarsi alle membrane cellulari alterandone funzioni e permeabilità (ad esempio facendo aumentare l'influsso di ioni  $\text{Ca}^{++}$  e l'efflusso di  $\text{K}^+$ , alterando il pH intracellulare e interferendo con recettori esposti, ecc). Esso può interagire anche con DNA e mRNA nel citosol, nel nucleo o negli organelli, influenzando l'espressione genica e la traduzione dei messaggeri. Inoltre funge da agente chelante verso vari ioni metallici grazie al suo alto contenuto di azoto (Hadwiger, 1999; Rabea *et al.*, 2003). Tutte queste funzioni possono avvenire sia all'interno delle cellule vegetali che in quella dei microorganismi patogeni. Il chitosano, quindi, svolge una duplice azione antimicrobica: stimola le difese della pianta e contemporaneamente inibisce direttamente la crescita del patogeno (Hadwiger, 1999). La sua efficacia dipende soprattutto dal grado di polimerizzazione e di acetilazione (Hadwiger, 1999; Rabea *et al.*, 2003). Da essi, oltre che da pH, temperatura, peso molecolare, concentrazione e forza ionica, dipendono anche la sua solubilità e la viscosità della soluzione. Normalmente il chitosano non è solubile in acqua ma in acidi deboli (Rabea *et al.*, 2003).

Numerosi studi hanno dimostrato gli effetti del chitosano o di estratti di parete fungina nell'elicitazione di vari meccanismi di difesa e della produzione di composti fenolici, per esempio nelle sospensioni di cellule di *Arabidopsis thaliana* (Ndimba *et al.*, 2003), in piantine di *Ocimum basilicum* (Kim *et al.*, 2005), in mesocotili di *Sorghum bicolor* (Lo e Nicholson, 1998) ed in plantule *in vitro* di *Vitis vinifera* (Bézier *et al.*, 2002; Ait Barka *et al.*, 2004).

# **SCOPO DELLA TESI**

I composti polifenolici vegetali negli ultimi anni hanno suscitato sempre maggior interesse a causa delle loro proprietà antiossidanti e degli effetti benefici che esplicano sulla salute umana. Le industrie farmaceutiche, alimentari e cosmetiche ricercano oggi queste molecole, pure o in miscele, per utilizzarle come materie prime o principi attivi di svariati preparati. L'industria agraria, inoltre, sta rivalutando le colture di piante contenenti sostanze dalle caratteristiche nutraceutiche, cioè che svolgono una funzione benefica sulla salute umana, e si sta orientando verso la produzione di alimenti funzionali, ovvero aventi una maggior quantità di composti benefici.

La vite (*Vitis vinifera* L.) è stata da sempre utilizzata dall'uomo nella dieta e nella medicina tradizionale. Produce, infatti, numerosi metaboliti secondari utili, soprattutto polifenoli, fra cui il resveratrolo e gli altri stilbeni. L'identificazione di un buon elicitore dei composti polifenolici *in vitro* è il punto di partenza per studi *in vivo* per la produzione di alimenti funzionali, cioè di uve e vini con un maggior contenuto di tali composti benefici. Inoltre, la messa a punto di un sistema di coltura cellulare *in vitro* e del suo scale-up, può aprire la strada a produzioni di molecole di interesse industriale su larga scala.

Per perseguire entrambi questi obiettivi occorre approfondire lo studio del metabolismo secondario coinvolto ed i cambiamenti indotti dall'elicitore, compresi gli effetti non previsti su altre vie. Conoscere la via biosintetica (intermedi ed enzimi) di un metabolita di cui si vuole stimolare la produzione, infatti, è un passaggio fondamentale per eseguire interventi mirati.

Durante la mia Tesi di Laurea, e più in generale nel Laboratorio di Biotecnologie Vegetali del Prof. Bagni, sono state saggiate numerose sostanze (Ferri, 2005; Franceschetti *et al.*, 2005; Tassoni *et al.*, 2005; Ferri *et al.*, 2007; Righetti *et al.*, 2007) con l'obiettivo di individuare un buon elicitore del metabolismo degli stilbeni nel sistema modello adottato, cioè in sospensioni cellulari ottenute da espianti di piccioli fogliari di vite (*Vitis vinifera* L.) della cultivar Barbera. Identificato nel chitosano alla concentrazione 50 µg/mL un buon elicitore, durante il periodo del Dottorato ho voluto verificare ed approfondire numerosi aspetti del suo effetto sulle colture.

Innanzitutto sono state verificate la sua eventuale citotossicità sulle cellule e la sua efficacia nello stimolare o reprimere l'accumulo intracellulare ed il rilascio nel terreno di 24 composti polifenolici (7 stilbeni, 10 flavonoidi, 6 acidi idrossicinnamici e 1 tannino) e degli antociani totali.

Una seconda parte di lavoro ha avuto l'obiettivo di verificare quali cambiamenti il chitosano induce nell'accumulo di proteine coinvolte nei metabolismi degli stilbeni e dei flavonoidi, tali da poter giustificare gli effetti riscontrati sui prodotti analizzati. Sono state perciò svolte analisi di proteomica di espressione, definita come lo studio della differenza di espressione fra due popolazioni proteiche. Le analisi sono state eseguite su estratti totali di cellule nel giorno di massima produzione di resveratrolo. Sulle stilbeni sintasi identificate (l'enzima che catalizza l'ultimo passaggio della via biosintetica) è stato eseguito uno studio del grado di fosforilazione.

Per identificare i possibili siti di biosintesi del resveratrolo e verificare se essi variano in seguito al trattamento con chitosano, è stata eseguita l'immunolocalizzazione della stilbene sintasi in protoplasti. Allo stesso scopo le analisi proteomiche sono state ripetute sulle proteine di frazioni subcellulari. La stessa analisi di immunolocalizzazione è stata eseguita anche su protoplasti ottenuti da bacca per controllare se vi siano differenze dovute all'espianto d'origine.

Un altro obiettivo è stato appurare, tramite analisi di northern blot, se il chitosano induce un aumento della trascrizione degli enzimi coinvolti nel metabolismo degli stilbeni o di alcune altre proteine identificate con le analisi proteomiche.

Infine, le stesse sospensioni cellulari da picciolo di Barbera sono state utilizzate come inoculo per bioreattori da un litro, allo scopo di studiare l'effetto del passaggio di scala e di ottimizzare le condizioni per la formazione di stilbeni in una prospettiva produttiva pre-industriale.

# **MATERIALI e METODI**

## **1. COLTURE CELLULARI**

Le colture cellulari sono state ottenute da espianti di piccioli fogliari e bacche immature di piante di *Vitis vinifera* L. cv. Barbera, appartenenti alla Collezione di Germoplasma di vite del Dipartimento di Produzione Vegetale, Università degli Studi di Milano, con sede a Torrazza Coste (PV).

### **1.1 Sterilizzazione degli espianti ed induzione di callo**

Gli espianti di picciolo fogliare e di bacca di vite Barbera (*Vitis vinifera* L.) sono stati abbondantemente lavati sotto acqua deionizzata corrente, sterilizzati per 2 minuti con etanolo 70 % (v/v) e per 10 minuti con candeggina commerciale al 10 % (v/v) addizionata di uno spruzzo di detersivo per piatti. Dopo essere stati risciacquati 3 volte con acqua deionizzata sterile, sono stati tagliati prima di essere posti sul terreno di induzione in piastre Petri. I piccioli sono stati privati delle estremità e tagliati in pezzi di circa 1 cm, mentre le bacche sono state tagliate a metà trasversalmente.

Il terreno di induzione utilizzato è un Murashige e Skoog (MS) (Murashige e Skoog, 1962) solido a basso contenuto di saccarosio ed opportunamente addizionato di ormoni. La composizione finale è la seguente:

#### **Macroelementi:**

KNO <sub>3</sub>	1900 mg/L
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650 mg/L
CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	440 mg/L
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	370 mg/L
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170 mg/L

#### **Microelementi:**

MnSO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O	22,3 mg/L
ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	8,6 mg/L
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6,2 mg/L
KI	0,83 mg/L
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0,25 mg/L
CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O	0,025 mg/L
CoCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	0,025 mg/L

Ferro chelato:

Na <sub>2</sub> EDTA	74,6 mg/L
FeSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	55,6 mg/L

Vitamine:

Mio-inositolo	100,0 mg/L
Acido nicotinico	0,5 mg/L
Piridossina HCl	0,5 mg/L
Tiamina HCl	0,1 mg/L

Amminoacidi:

glicina	2,0 mg/L
---------	----------

Zuccheri:

saccarosio	10 g/L
------------	--------

Ormoni:

6-benzilammino-purina (BAP)	1,0 mg/L
acido 2,4-diclororo-fenossi-acetico (2,4-D)	0,1 mg/L

Gelificante:

Phytigel	2,8 g/L
----------	---------

PH: 5,6-5,8

Le piastre sono state mantenute ad una temperatura costante di  $24 \pm 1^\circ\text{C}$  e sottoposte ad un fotoperiodo di 16 ore di luce alternate a 8 ore di buio con una irradiazione di  $25 \text{ W/m}^2$ .

Dopo 4 settimane il callo è stato isolato dal tessuto d'origine e mantenuto in coltura separatamente (Figura 12a). Le colture sono state trasferite mensilmente su terreno fresco fino al loro passaggio in terreno liquido. Terreno di mantenimento e terreno di induzione hanno la medesima composizione.

## **1.2 Sospensioni cellulari**

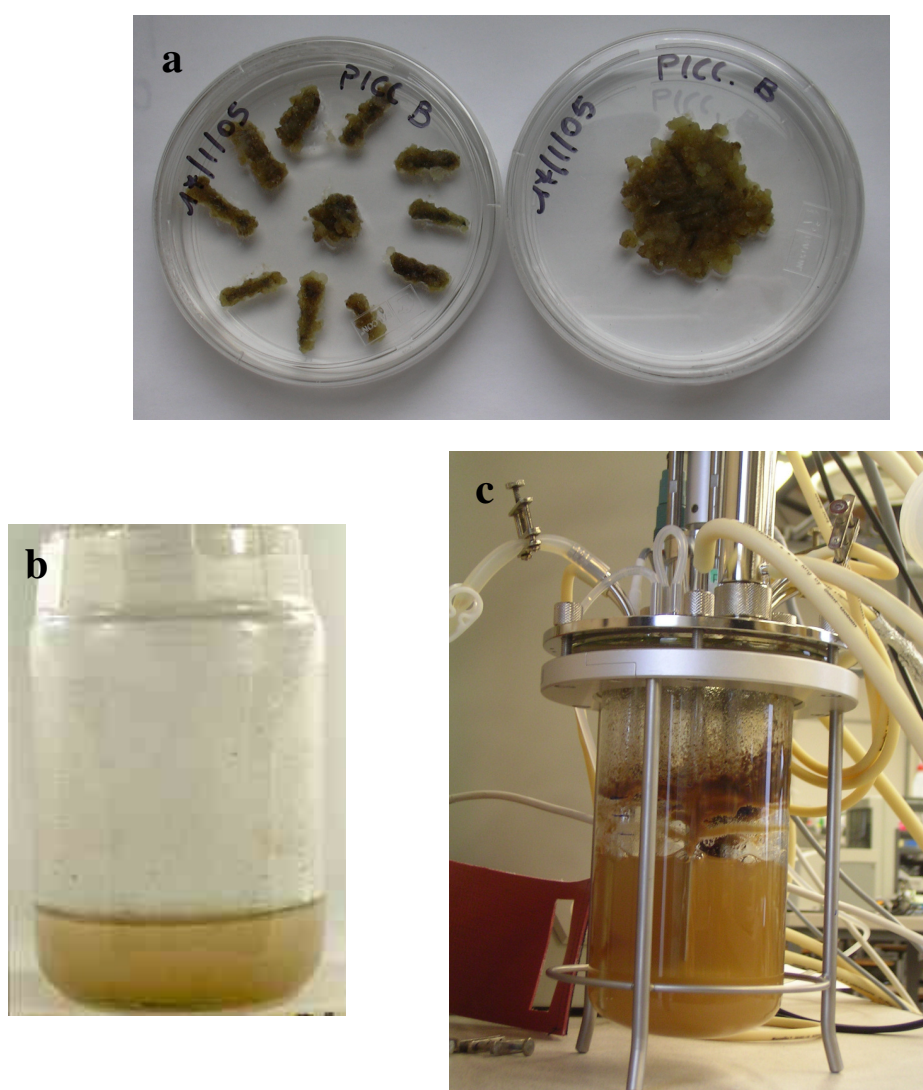
L'inoculo in terreno liquido è stato eseguito trasferendo 2 g (peso fresco) di callo in 20 mL di terreno MS in boccetti Baby-food (Sigma) di vetro da 200 mL (Figura 12b). E' stato utilizzato un terreno MS liquido avente la stessa composizione del solido ma privo del gelificante (paragrafo 1.1).



Le sospensioni cellulari sono state mantenute in un volume di 20 mL, in agitazione costante su un agitatore orbitale orizzontale ad una velocità di 100-120 rpm ed alle stesse condizioni ambientali di crescita dei calli.

Le sospensioni cellulari sono state duplicate ogni 2 settimane, cioè ogni 15 giorni si sono subcolturali 10 mL di sospensione cellulare in 10 mL di terreno nuovo, ottenendo così un raddoppio del volume totale di coltura.

Prima dell'utilizzo, terreno e bocchetti sono stati sterilizzati in autoclave alla temperatura di 120°C ed alla pressione di 1,0 atm per 20 minuti. Tutte le operazioni successive sono state eseguite in condizioni sterili all'interno di una cappa a flusso laminare orizzontale.



**Figura 12.** Colture cellulari di picciolo di Barbera (*Vitis vinifera* L.). (a) induzione di callo su terreno solido; (b) 20 mL di coltura in terreno liquido in bocchetto; (c) cultura in bioreattore da 1 L.

### 1.3 Colture in bioreattore

Le sospensioni cellulari da picciolo di Barbera sono state utilizzate come inoculo per fermentatori da un litro (Figura 12c), allo scopo di studiare l'effetto del passaggio di scala in una prospettiva produttiva pre-industriale.

Sono stati impiegati 2 bioreattori Applikon (Applikon Biotechnology, Schiedam, Paesi Bassi) gestiti tramite ADI 1025 Bio Console (Applikon Biotechnology) e ADI 1010 Bio Controller (Applikon Biotechnology) che controllano temperatura, pH, ossigeno disciolto, schiuma, agitazione. Il processo è stato seguito tramite il programma BioXpert Lite (Applikon Biotechnology). Aria sterile è stata insufflata da un compressore tramite un L-type sparger. La sterilità dei gas in ingresso ed in uscita è stata garantita da filtri con diametro di 0,2  $\mu\text{m}$ . Il sistema di regolazione termica comprendeva una camicia riscaldante avvolta esternamente al bioreattore (che, quindi, limitava il passaggio della luce) ed uno scambiatore di calore per raffreddare dall'interno. Inoltre era presente un condensatore per contrastare l'evaporazione. La forza per l'agitazione era data da un motore stirrer motor P100 che imprimeva la rotazione ad un asse verticale centrale su cui erano inserite le eliche. Sono state provate due differenti tipi di eliche: una coppia di eliche a turbina (rushton impeller) con diametro 4,5 cm e 6 pale di 1,1 x 1,1 cm ed un'elica marina (marine impeller) con diametro di 4 cm, altezza di 3 cm e 3 pale arrotondate lunghe 4,7 cm ed inclinate di 45°.

Allo scopo di ottimizzare la crescita delle colture per la produzione di polifenoli, quindi alcuni parametri sono stati mantenuti fissi in tutte le fermentazioni su valori scelti sulla base dell'esperienza con le colture in fiasca da 20 mL (Tassoni *et al.*, 2005). Altri parametri sono stati ottimizzati nel corso di diverse fermentazioni successive. La possibilità fornita dal sistema di mantenere costante il pH non è stata utilizzata preferendo misurare questo parametro in continuo per seguire le variazioni impostegli dalle cellule.

I parametri mantenuti costanti sono stati il volume di coltura (800 mL, cioè 40 volte quello delle beute), l'età dell'inoculo (cellule al quattordicesimo giorno di coltura, cioè fra la fine della fase esponenziale di crescita e l'inizio della fase stazionaria), la temperatura (24°C), il tempo fra 2 aggiunte successive di terreno fresco (2 settimane). Il terreno utilizzato ha la stessa composizione di quello usato per le sospensioni cellulari in beuta (paragrafo 1.1) con 2 sole varianti: l'aggiunta di 25  $\mu\text{g/mL}$  dell'antibiotico rifampicina (Ferri *et al.*, 2007) e la concentrazione di saccarosio. La quantità dello zucchero (10 o 30 g/L) è stato uno dei parametri presi in considerazione per l'ottimizzazione. Gli altri sono stati l'aria insufflata (0,2 0,25 o 0,5 vvm, cioè 0,16 0,2 o 0,4 L/min), l'agitazione (eliche a turbina o elica marina,

diverse velocità di rotazione), concentrazione dell'inoculo (50 % del volume colturale, fra 12 e 56 g), permanenza della coltura in bioreattore (da 1 a 3 cicli consecutivi, cioè da 2 a 6 settimane con alimentazione ogni 14 giorni).

Le colture cresciute in bioreattore nelle condizioni ottimizzate sono state trattate con chitosano alle concentrazioni di 50 e 100 µg/mL (paragrafi 2.1 e 2.2).

Ogni giorno è stato prelevato un campione di coltura per le analisi dei parametri di crescita (paragrafi da 3.1 a 3.4) e la determinazione del contenuto di resveratrolo e altri polifenoli tramite HPLC (capitolo 4).

## **2. ELICITAZIONE**

Durante la mia tesi di laurea e più in generale nel Laboratorio di Biotecnologie Vegetali del Prof. Bagni, sono state saggiate numerose sostanze (Ferri, 2005; Franceschetti *et al.*, 2005; Tassoni *et al.*, 2005; Ferri *et al.*, 2007; Righetti *et al.*, 2007) con l'obiettivo di individuare dei buoni elicitori del metabolismo degli stilbeni nel sistema modello adottato. Nel corso della mia tesi di laurea ho identificato nel chitosano alla concentrazione 50 µg/mL un buon elicitore per le colture cellulari di picciolo di Barbera (Ferri, 2005; Righetti *et al.*, 2007) e quindi questo trattamento è alla base di questa Tesi di Dottorato.

### **2.1 Preparazione della soluzione di chitosano**

Il chitosano non è idrosolubile, quindi la soluzione madre 5 mg/mL è stata preparata solubilizzando il polisaccaride (76-139 kDa, chitosan low-viscous, Fluka) in acido acetico 1 % (v/v). Dopo una notte a 4°C, la soluzione ed il solo solvente sono stati portati a pH 5,2 con KOH e sterilizzati per filtrazione (filtri sterili da 0,22 µm, Millex GP, Millipore, Carrigtwohill, Co. Cork, Ireland).

### **2.2 Trattamento delle colture**

Un volume di 200 µL della soluzione di chitosano è stato addizionato al terreno al giorno 0 della time course in ogni bocchetto da 20 mL di coltura. Un pari volume di acido acetico (concentrazione finale 0,01 %) è stato fornito alle colture del controllo relativo. Infatti, non essendo il chitosano idrosolubile, oltre al controllo non trattato, sulle colture di Barbera è stato eseguito anche un controllo col solo solvente, per verificare quali effetti esso abbia

sull'andamento delle colture e sulla produzione di stilbeni, così da poter poi valutare i reali effetti del chitosano.

L'inoculo cellulare è stato fatto a partire da un sufficiente volume di coltura omogenea raccolto in una bottiglia e mantenuto in agitazione manuale.

Sono stati preparati 3 boccetti per ogni giorno di analisi, per ogni trattamento e controllo, e le colture così predisposte sono state mantenute in agitazione orizzontale a 100-120 rpm ed alle stesse condizioni ambientali di crescita delle colture di mantenimento (vedi paragrafo 1.2). A giorni alterni, a partire dal giorno dell'inoculo (t0, t2, t4, t7, t9, t11, t14), sono stati prelevati 3 boccetti su cui sono state eseguite le analisi.

### **3. ANALISI DELLE CARATTERISTICHE DELLE COLTURE CELLULARI IN TIME-COURSE**

Gli effetti dei trattamenti sono stati valutati considerando i seguenti parametri misurati a giorni alterni su una time-course di 14 giorni: numero di cellule, vitalità cellulare, pH, peso fresco, peso secco, tempo medio di duplicazione della biomassa (TMD). Sui campioni al quarto giorno di coltura è stata saggiata la produzione di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Tutte le analisi sono state eseguite in triplicato.

In una fase successiva è stato quantificato tramite HPLC il contenuto di resveratrolo e di altri stilbeni e flavonoidi in ogni campione di cellule e di terreno raccolto e conservati a -80°C. Nei campioni di cellule sono stati misurati anche gli antociani totali.

#### **3.1 Conteggio del numero di cellule**

Allo scopo di misurare la quantità di biomassa prodotta è stata utilizzata una camera di conta Nageotte. Essa ha una griglia suddivisa in 2 camere uguali, ognuna delle quali ripartita in 2 emicamere formate da 20 righe. Dopo aver caricato la sospensione cellulare adeguatamente diluita in una camera, si sono contate le cellule contenute in 10 righe non consecutive. La loro somma è stata moltiplicata per 80 (fattore della camera) e per il fattore di diluizione, in modo da ottenere la concentrazione di cellule per mL della sospensione di partenza.

Contare a giorni alterni il numero di cellule (senza distinzione fra morte e vive) ha permesso di costruire una curva di crescita della biomassa.

### **3.2 Saggio della vitalità cellulare**

Per il saggio di vitalità è stato utilizzato un colorante fluorescente, il diacetato di fluoresceina (Sigma), che marca specificatamente le cellule vive (Darzynkiewicz *et al.*, 1994). E', infatti, in grado di superare parete cellulare e plasmalemma localizzandosi nel citoplasma, dove entrano in azione le diacetilasi citosoliche che liberano la fluoresceina, il fluorocromo fluorescente che non è più in grado di diffondere fuori dalla cellula. L'azione delle diacetilasi è quasi istantanea, in questo modo, entro un paio di minuti, appaiono colorati solo i citoplasmi delle cellule vive, in quanto il diacetato rimasto nel mezzo di coltura o penetrato in cellule morte non è scisso e quindi il fluorocromo non emette fluorescenza.

Il colorante è stato preparato sciogliendo il diacetato di fluoresceina in acetone alla concentrazione di 1 mg/mL. Questa soluzione madre è stata diluita 1:10 in acqua deionizzata al momento dell'utilizzo.

L'analisi è stata effettuata posizionando una piccola aliquota di sospensione cellulare su di un vetrino portaoggetti per microscopia e colorandola con un pari volume di diacetato di fluoresceina 0,1 mg/mL. Dopo circa 1 minuto la preparazione è stata osservata ad un microscopio a fluorescenza Nikon Eclipse E600 con lampada al mercurio, usando un filtro specifico per il colorante (B-2A: EX 450-490, DM 505, BA 520). In questo modo le cellule vive appaiono colorate di verde.

Il valore di vitalità cellulare è stato espresso come percentuale stimata di cellule vive sul totale osservabile in luce polarizzata.

### **3.3 Misurazione del pH della coltura**

Il pH della coltura è stato misurato con un pHmetro Beckman  $\Phi$ 340 pH/Temp Meter.

Il valore del pH del terreno è indicativo delle condizioni della coltura. Bassi valori di pH indicano, infatti, una acidificazione del mezzo e quindi una situazione di stress dovuta alla tossicità dell'elicitore o ad inquinamenti. In questi casi, infatti, le cellule reagiscono rilasciando protoni, sintomo di lisi cellulare in corso.

### **3.4 Misurazione del peso cellulare e calcolo del TMD**

La sospensione cellulare è stata filtrata su filtro di nylon con cut off 70  $\mu$ m. Le cellule sono state pesate (FW, fresh weight) su di una bilancia di precisione e poi conservate a -80°C. Del terreno filtrato è stato misurato il volume e quindi lo si è conservato anch'esso a -20°C.

Entrambi i tipi di campioni sono stati utilizzati successivamente per la determinazione del contenuto di resveratrolo tramite analisi HPLC.

Coi dati del peso fresco delle cellule si è potuto calcolare il tempo medio di duplicazione della biomassa (TMD), un parametro indicativo del tasso di crescita della coltura. Si è utilizzata la seguente formula:

$$TMD = \frac{t \cdot \ln 2}{\ln \left( \frac{FW_e}{FW_0} \right)}$$

dove “FW<sub>e</sub>” corrisponde al peso fresco medio misurato al termine della coltura, “FW<sub>0</sub>” al peso fresco iniziale, t alla durata in giorni di un ciclo di coltura (14 giorni).

Il peso secco è stato misurato ponendo in stufa a 80°C un campione pesato di cellule di ogni giorno di time course e misurando il peso dopo 48 ore. Si è poi calcolato il valore medio in termini di percentuale di peso fresco.

### 3.5 Controllo della presenza di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

L’accumulo di acqua ossigenata all’interno delle cellule è sintomo di stress ossidativo. La sua eventuale presenza è stata controllata in campioni di cellule controllo e trattate con chitosano al quarto giorno di coltura, tramite un saggio colorimetrico modificato da quello descritto da Iriti *et al.* (2003).

Una aliquota di coltura cellulare è stata incubata per 4 ore al buio in presenza di 1 mg/mL di 3,3’-diaminobenzidina (DAB) in 0,1 N HCl, pH 5,6 (aggiustato con NaOH). In questo modo l’acqua ossigenata assume una colorazione rossiccia-marrone e l’osservazione al microscopio ottico ne rivela la presenza all’interno delle cellule.

### 3.6 Quantificazione di saccarosio e glucosio

I campioni di cellule (0,5 g) omogenate meccanicamente in un tampone Tris 100 mM HCl a pH 7.5 e quelli di terreno filtrato (1 mL) durante la *time-course* sono stati incubati per un’ora in un bagno a 60°C allo scopo di facilitare la solubilizzazione degli zuccheri. In seguito sono stati centrifugati a 15000g per 10 minuti ed il surnatante è stato utilizzato per la determinazione della concentrazione di saccarosio e glucosio tramite il “Sucrose Assay Kit” della Sigma.

Il kit è costituito da un’invertasi che idrolizza il saccarosio in fruttosio e glucosio, un’esochinasi che fosforila entrambi ed una glucosio-6-fosfato deidrogenasi che ossida il

glucosio-6-fosfato a 6-fosfogluconato. Quest'ultima reazione richiede la presenza di  $\text{NAD}^+$  che viene ridotto a NADH in quantità equimolare causando un incremento di assorbanza a 340 nm, direttamente proporzionale alla concentrazione di saccarosio. Per quantificare il glucosio è sufficiente omettere l'enzima invertasi.

Sono necessari 2 bianchi uguali per tutte le analisi: il bianco relativo dell'invertasi preparato con 100  $\mu\text{l}$  di Sucrose Assay Reagent (bianco SAR) e 100  $\mu\text{l}$  di acqua e quello relativo agli altri enzimi con 200  $\mu\text{l}$  di acqua (bianco GAR). I campioni sono stati diluiti ad una concentrazione di zucchero compresa tra 100 e 1000  $\mu\text{g}$  saccarosio/ml e per ognuno è stato preparato un bianco con 100  $\mu\text{l}$  di campione e 100  $\mu\text{l}$  di acqua. I campioni veri e propri sono stati miscelati 1:1 con 100  $\mu\text{l}$  di SAR. Dopo 10 minuti a temperatura ambiente sono stati aggiunti 1,8 ml di Glucose Assay Reagent (GAR). Dopo altri 15 minuti a temperatura ambiente sono state eseguite le letture allo spettrofotometro misurando l'assorbanza a 340 nm.

La concentrazione di saccarosio in mg/ml è stata calcolata tramite una formula fornita con il kit:

$$A_{\text{bianco tot}} = (A_{\text{bianco campione}} - A_{\text{bianco GAR}}) + A_{\text{bianco SAR}}$$

$$\Delta A = A_{\text{campione}} - A_{\text{bianco tot}}$$

$$\text{mg/ml di saccarosio} = \frac{(\Delta A) (VT) (PM \text{ saccarosio}) (F)}{(\epsilon) (d) (VC) 1000}$$

A = assorbanza a 340 nm

VT = volume totale = 2,0 ml

PM saccarosio = peso molecolare del saccarosio = 342,30 Da

F = fattore di diluizione

$\epsilon$  = coeff. di estinzione molare per NADH a 340 nm = 6,22 (ml/ $\mu\text{moli}$ )(1/cm)

d = cammino ottico = 1 cm

VC = volume del campione = 0,1 ml

Per la quantificazione del glucosio la formula è stata così modificata:

$$\Delta A = A_{\text{bianco campione}} - A_{\text{bianco glucosio}}$$

$$\text{mg/ml di glucosio} = \frac{(\Delta A) (VT) (PM \text{ glucosio}) (F)}{(\epsilon) (d) (VC) 1000}$$

PM glucosio = peso molecolare del glucosio = 180,16 Da

## **4. DETERMINAZIONE DEL CONTENUTO DI RESVERATROLO E ALTRI STILBENI E FLAVONOIDI MEDIANTE HPLC**

Il contenuto di *trans* e *cis*-resveratrolo delle cellule e del terreno in cui sono cresciute è stato valutato tramite cromatografia liquida ad alta prestazione (HPLC). Da entrambi i tipi di campioni congelati sono stati estratti gli stilbeni, sui quali si è proceduto all'analisi cromatografica.

La time course e le analisi successive (estrazione degli stilbeni e HPLC) sono state eseguite una prima volta nell'anno 2003 nell'ambito della mia tesi di laurea e del primo anno di dottorato (metodi 1). Nei mesi di settembre e ottobre del 2006 sono state ripetute sia per convalidare i risultati ottenuti, sia perché nel frattempo la strumentazione del laboratorio era stata implementata con un rivelatore a fotodiodi (diode array detector, DAD) per l'HPLC ed erano stati ottimizzati nuovi protocolli operativi di estrazione e separazione dei metaboliti (metodi 2). Inoltre al tempo dei metodi 1 erano disponibili solo gli standard di *trans* e *cis*-resveratrolo, mentre nel 2006 si era arrivati, fra standard commerciali e non, ad un totale di 24 composti identificabili in un'unica corsa HPLC.

Qui di seguito sono quindi descritti entrambi i protocolli utilizzati.

### **4.1 Estrazione di stilbeni dal terreno di coltura (metodo 1)**

Dal terreno di coltura sono stati estratti gli stilbeni prima di procedere alla quantificazione del resveratrolo tramite analisi HPLC. Tutti i campioni trattati e controlli sono stati estratti in contemporanea, così da risentire delle medesime condizioni operative.

I 3 campioni di terreno filtrati e conservati a -20°C in ogni giorno della time-course, uno per ogni replica, sono stati scongelati e riuniti insieme. Dopo una centrifugazione di 3-5 minuti a 750g, sono stati filtrati attraverso un filtro Whatman GF/B montato su supporto Millipore per eliminare eventuali residui di cellule. Il filtrato è stato separato in due parti: con 20 mL si è proseguita l'estrazione, mentre il rimanente è stato nuovamente congelato a -20°C.

In una Falcon da 50 mL sono stati raccolti i 20 mL di filtrato per l'estrazione e si sono aggiunti 10 mL di bicarbonato di sodio 5 % (w/v) con la funzione di antischiuma e 10 mL di etile acetato. Dopo 30 secondi sul vortex sono stati aggiunti altri 10 mL di etile acetato e sono seguiti altri 30 secondi sul vortex. L'etile acetato è il solvente estrattore degli stilbeni e i due passaggi in vortex sono le vere fasi di estrazione in quanto permettono di estendere ed agitare la superficie di contatto fra campione e solvente. Un minuto in centrifuga a 750g ha reso più netta la separazione fra le due fasi: quella inferiore acquosa con il terreno e il bicarbonato e



quella superiore organica formata dall'etile acetato e contenente il resveratrolo estratto. 15 ml della fase superiore sono stati concentrati con un Rotavapor (Rotavapor R-205, BÜCHI Labortechnik, Konstanz, Germany) e poi portati a secco tramite evaporazione a 45°C in Speed vacuum (Speed Vac PD1, Savant Instruments, Holdbrook, NY, USA).

In questo modo sono stati ottenuti i campioni per l'analisi HPLC, conservabili al buio e a -20°C.

Con una estrazione liquido-liquido di questo tipo, vengono estratti gli stilbeni in forma non coniugata (oltre ad altri composti dalle caratteristiche chimiche simili, come alcuni flavonoidi) ma non, ad esempio, i derivati glucosilati del resveratrolo che rimangono nella fase sottostante. E' inoltre importante che i campioni siano tenuti al buio durante l'estrazione perchè le radiazioni UV inducono isomerizzazione dalla forma *trans* alla forma *cis* degli stilbeni.

#### **4.2 Estrazione di stilbeni da cellule (metodo 1)**

Anche dai campioni di cellule raccolti durante le time-course, il resveratrolo è stato recuperato con una estrazione con solvente analoga a quella utilizzata per i terreni. In questo caso, però, è stata necessaria una preliminare omogenizzazione delle cellule.

Della massa cellulare raccolta in un giorno di time-course si è pesato circa 1 grammo e, senza scongelarlo, lo si è omogenato in un potter di vetro con 2 mL di metanolo 95 % (v/v). Con altri 3 mL di metanolo si è lavato il potter e tutta la sospensione ottenuta è stata posta per 1 ora in agitazione orizzontale a circa 100 rpm, al buio e a temperatura ambiente. Al termine di questa incubazione le cellule dovrebbero essere totalmente frammentate e lisate. Si è allora filtrata la sospensione attraverso un filtro Whatman GF/B su supporto Millipore per eliminare i residui cellulari. Il filtrato è stato evaporato in Speed Vac per 15 minuti a 40°C, in modo da rimuovere completamente il metanolo ma non l'acqua. Il campione ottenuto è stato posto in una Falcon da 50 mL e si è proceduto con l'estrazione con solvente con 5 mL di bicarbonato di sodio 5 % (w/v) e 10 mL di etile acetato (due aggiunte da 5 mL), analogamente a quanto fatto coi campioni di terreno. 8 mL della fase organica superiore sono stati concentrati al Rotavapor e portati a secco in Speed vacuum a 45°C.

I campioni così ottenuti sono stati conservati al buio e a -20 °C fino al momento dell'analisi cromatografica.

Anche in questo caso si estraggono solo gli stilbeni non coniugati e non quelli glucosilati e occorre tenere i campioni al buio durante l'estrazione per evitare l'isomerizzazione *trans-cis* degli stilbeni.

#### **4.3 Preparazione dei campioni (metodo 1)**

L'analisi HPLC è stata eseguita sugli estratti da cellule e terreno di coltura. I campioni portati a secco in Speed vacuum sono stati risospesi in 200 µL di acetonitrile prima di essere iniettati nello strumento.

Dopo la risospensione si conservano al buio a -20°C.

#### **4.4 Analisi cromatografica (metodo 1)**

L'utilizzo di un sistema per cromatografia liquida ad alta prestazione (High Performance Liquid Chromatography) ha consentito di separare le differenti sostanze (stilbeni, ma anche altre sostanze come ad esempio fenoli) presenti all'interno degli estratti mediante migrazione differenziale in un sistema bifasico, sfruttando la distribuzione selettiva e reversibile di tali sostanze tra la fase mobile e la fase stazionaria.

Il sistema HPLC utilizzato è un Jasco LC-1500 (Jasco Corporation, Japan) costituito da:

- pompa a portata variabile, che forza la fase mobile attraverso la colonna mantenendo il flusso costante;
- degasatore, per eliminare eventuali bolle di gas dagli eluenti prima che arrivino in colonna dove bloccherebbero il sistema;
- miscelatore, per unire nella giusta proporzione i due eluenti;
- rivelatore UV/visibile, per individuare tramite misure di assorbanza alla lunghezza d'onda impostata dall'utente le sostanze in uscita dalla colonna;
- colonna cromatografica Phenomenex Luna C18(2), con dimensioni di 250 x 4,6 mm e contenente particelle del diametro di 5 µm, munita di precolonna (SecurityGuard Ea, Phenomenex, Torrance CA, USA);
- computer col programma Jasco-Borwin Chromatography Software per analizzare i dati in uscita dal rivelatore e mostrare i cromatogrammi.

La separazione dei composti presenti avviene mentre il campione, addizionato agli eluenti della fase mobile, scorre all'interno della colonna cromatografica. Gli eluenti utilizzati sono acetonitrile 100 % e un tampone fosfato 0,02 M a pH 3 (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> in acqua Plus per HPLC (Merck, Whitehouse Station, NJ, USA)). Di ogni campione è stato analizzato un volume di 20 µL mediante iniezione con apposito loop.

La durata di ogni analisi è stata di 29 minuti, più 5 minuti di post-analisi e riequilibrio della colonna, per un totale di 35 minuti di corsa per ogni campione. Per tutto il tempo il flusso è stato mantenuto costante a 1,0 mL/min, ma la percentuale dei 2 eluenti è stata variata secondo il seguente gradiente:

Tempo (min)	% acetonitrile	% tampone fosfato
0	10	90
5	10	90
8	20	80
10	20	80
13	40	60
25	40	60
27	10	90
35	10	90

Ogni campione è stato analizzato due volte sottoponendolo a due diverse lunghezze d'onda della radiazione ultravioletta: 305 nm per rilevare il *trans*-resveratrolo, 285 nm per l'isomero *cis*. Da ciascuna analisi si è ottenuto un cromatogramma a picchi rappresentante il segnale ricevuto dal rivelatore UV (assorbanza) in funzione del tempo, con cui è stato possibile calcolare la quantità di resveratrolo presente nel campione tramite confronto con gli standard. Il *trans*-resveratrolo (*trans*-3,5,4'-triidrossistilbene, Sigma) è stato preparato in una soluzione stock 5 mM in etanolo 100 % che può essere conservata a 4°C e al buio per alcuni mesi. Diluendo la soluzione stock 1:100 con una soluzione di acido fosforico 0,2 M:acetonitrile 4:1 (v/v) è stata ottenuta la cosiddetta soluzione di lavoro alla concentrazione di 50 µM. Lo standard è stato iniettato in HPLC alla concentrazione di 5 µM, cioè è diluito ancora 1:10 in acetonitrile al momento dell'utilizzo. Lo standard di *cis*-resveratrolo, non disponibile in commercio, è stato ottenuto irradiando la soluzione dell'isomero *trans* a 254 nm (UV) per 60 minuti, come descritto da Goldberg *et al.* (1995). La conversione *trans-cis* non è completa:

occorre calcolare la percentuale di forma *trans* residua, che mediamente è circa 5 %. Lo standard dell'isomero *cis* è maggiormente soggetto a degradazione rispetto al *trans*.

I tempi di ritenzione variano sensibilmente in funzione della temperatura di lavoro: si è notata una anticipazione dei picchi anche di un paio di minuti nel corso della giornata con l'aumentare della temperatura ambientale. Per questo motivo, per riconoscere con certezza il picco del resveratrolo, l'analisi di ogni serie di campioni (cioè di ogni trattamento) è stata preceduta da una iniezione dello standard e, quando lo si è reso necessario, la corsa di un singolo campione è stata seguita da quella del suo mix, cioè del campione stesso miscelato 2:1 con la soluzione di lavoro 50  $\mu\text{M}$  dello standard. L'identificazione del picco del resveratrolo, quindi, è stata eseguita per confronto del tempo di ritenzione fra il campione in esame e lo standard o il mix.

#### **4.5 Determinazione del contenuto di resveratrolo (metodo 1)**

Dall'area sottesa al picco del resveratrolo di ogni cromatogramma, è stato possibile risalire al contenuto della sostanza nel campione di partenza, cioè nel terreno di coltura o nelle cellule del corrispondente giorno di time-course.

I calcoli, nel caso del *trans*-resveratrolo, sono stati eseguiti comparando i dati dei campioni con l'area media dello standard alla concentrazione di 5  $\mu\text{M}$ , che corrisponde a 100 pmol nei 20  $\mu\text{L}$  iniettati.

Analogamente è stato calcolato il contenuto di *cis*-resveratrolo nel terreno di coltura e nelle cellule, tenendo però presente che lo standard *cis* conteneva ancora una percentuale di *trans*. Quindi all'area media dello standard 5  $\mu\text{M}$  non corrispondono 100 pmoli ma un valore inferiore, misurabile.

Gli stessi calcoli sono stati ripetuti per ognuno dei 7 campioni di ogni trattamento ed i risultati ottenuti sono stati riportati in grafico in termini di picomoli di resveratrolo per grammo di peso secco (pmol/gDW) o, per il terreno, di picomoli per mL (pmol/mL). Conoscendo la concentrazione cellulare (in peso fresco, gFW/mL, o secco, gDW/mL) è possibile esprimere anche i dati riferiti a campioni di terreno in pmol/gDW e quindi confrontarli coi dati dell'accumulo intracellulare.

#### **4.6 Estrazione di stilbeni dal terreno di coltura (metodo 2)**

I campioni di terreno sono stati scongelati, centrifugati a 750g per 3-5 minuti e filtrati attraverso un filtro Whatman GF/B montato su supporto Millipore per eliminare eventuali residui di cellule. Su un'aliquota di 5 mL di filtrato si è proceduto all'estrazione degli stilbeni, mentre il rimanente è stato nuovamente congelato a -20°C. I 5 mL sono stati estratti con una colonna StrataX (33 µm resina polimerica 60 mg in 3 mL, Phenomenex, Torrence CA, USA) ed eluiti con metanolo 100 %. L'eluato è stato portato a secco in Speed vacuum a 45°C e poi conservato a -20°C e al buio fino al momento dell'analisi HPLC.

Estraendo con le colonne StrataX, vengono eluiti anche gli stilbeni in forma coniugata e glucosilata, oltre ad altri composti dalle caratteristiche chimiche simili, come alcuni flavonoidi.

Anche con questo tipo di estrazione è importante mantenere i campioni al riparo dalla luce per evitare l'isomerizzazione *trans-cis* degli stilbeni.

#### **4.7 Estrazione di stilbeni da cellule (metodo 2)**

Anche i campioni di cellule sono stati estratti utilizzando le colonne StrataX, con un procedimento analogo a quello descritto per i campioni di terreno ma preceduto da una fase di lisi delle cellule.

Circa 0,5 grammi di cellule sono stati addizionati di 5 mL di metanolo 95 % (v/v) lasciati in agitazione orizzontale a circa 100 rpm, al buio e a temperatura ambiente per una notte. Al termine di questa incubazione le cellule dovrebbero essere completamente lisate ed i composti di interesse totalmente estratti. Si è allora filtrata la sospensione attraverso un filtro Whatman GF/B su supporto Millipore per eliminare i residui cellulari. Il filtrato è stato evaporato in Speed Vac e adeguatamente diluito con acqua in modo da portare la concentrazione di metanolo ad un valore inferiore al 5 % (v/v). E' seguita l'estrazione con colonna StrataX e l'eluizione con metanolo 100 %. I campioni sono poi stati portati a secco in Speed vacuum a 45°C e mantenuti a -20°C e al buio fino al momento dell'analisi HPLC.

#### **4.8 Preparazione dei campioni (metodo 2)**

Prima di essere iniettati in HPLC, i campioni di cellule e terreno di coltura portati a secco in Speed vacuum sono stati risospesi in 20 µL di acetonitrile e 180 µL di acqua acidulata (acqua Plus per HPLC (Merck, Whitehouse Station, NJ, USA) con acido acetico 0,02 % (v/v)).

Dopo la risospensione si conservano al buio a -20°C.

#### 4.9 Preparazione degli standard per HPLC (metodo 2)

L'uso del rivelatore a fotodiodi (HPLC-DAD) e l'ottimizzazione di un opportuno gradiente hanno permesso di migliorare la separazione cromatografica al punto da poter individuare numerosi composti. Per una buona interpretazione dei picchi nei cromatogrammi ottenuti occorre confrontarne area, tempi di ritenzione e spettri (se si è utilizzato un HPLC-DAD) con quelli degli standard.

Sono stati utilizzati i seguenti 24 standard di composti appartenenti a diverse famiglie di metaboliti secondari:

composto	abbreviazione	marca	solvente	tempo di ritenzione (min)	$\lambda$ osservata (nm)
<b>Stilbeni</b>					
<i>trans</i> -resveratrolo	t-RESV	Sigma	etanolo 100 %	21,6	305
<i>cis</i> -resveratrolo	c-RESV	n.c.	ac.fosforico 0,2M: acetonitrile 4:1 (v/v)	23,4	285
<i>trans</i> -piceide	t-PIC	n.c.	acetonitrile 16 % in HCl 0,1 %	16,3	305
<i>cis</i> -piceide	c-PIC	n.c.	acetonitrile 16 % in HCl 0,1 %	19,6	285
<i>trans</i> -resveratrolside	t-RDE	n.c.	acetonitrile 16 % in HCl 0,1 %	18,6	305
<i>cis</i> -resveratrolside	c-RDE	n.c.	acetonitrile 16 % in HCl 0,1 %	20,1	285
piceatannolo	PICEAT	Sigma	metanolo 100 %	23,8	323
<b>Flavonoidi</b>					
calcone	CALC	n.c.	etanolo 100 %	31,6	365
( $\pm$ )-naringenina	NAR	Sigma	metanolo 100 %	26,1	285
kaemferolo	KAE	Sigma	metanolo 100 %	33,5	365
quercetina	QUERC	Riedel-de Haen	metanolo 100 %	22,8	365
rutina	RUT	Sigma	metanolo 100 %	18,4	365
(+)-catechina	CAT	Sigma	metanolo 100 %	11,7	285
(-)-epicatechina	EC	Sigma	metanolo 100 %	14,6	285
epicatechina-3-gallata	ECG	Sigma	metanolo 100 %	18,9	270
epigallo catechina	EGC	Sigma	metanolo 100 %	10,3	270
(-)-epigallo	EGCG	Sigma	metanolo 100 %	15,1	285
catechina-3-gallata					

<b>Acidi idrossicinnamici</b>					
ac. <i>trans</i> -cinnamico	ACIN	Sigma	metanolo 100 %	25,2	285
ac. <i>p</i> -cumarico	ACUM	Fluka	metanolo 100 %	18,4	308
ac. caffeico	ACAFF	Sigma	metanolo 100 %	14,4	323
ac. <i>trans</i> -ferulico	AFER	Aldrich	metanolo 100 %	19,4	323
ac. sinapico	ASIN	Fluka	metanolo 100 %	19,3	323
ac. clorogenico	ACLOR	Sigma	metanolo 100 %	12,1	323
<b>Tannini</b>					
ac. gallico	AGAL	Sigma	metanolo 100 %	4,5	285

In realtà non è stato possibile determinare esattamente il livello di ECG ed EGC, presenti nella vite (Pfeiffer *et al.*, 2006), perché queste catechine sono tratteneute solo debolmente dalle colonnine Strata-X usate per la preparazione dei campioni e quindi il valore misurato è una forte sottostima.

I 6 composti elencati in tabella con marca “n.c.” non si trovano in commercio. Questi standard, quindi, sono stati ottenuti in laboratorio.

Oltre al piceatannolo, l'unico stilbene disponibile in commercio è il *trans*-resveratrolo (*trans*-3,5,4'-triidrossistilbene, Sigma), che è stato preparato come descritto nel paragrafo 4.4. Da esso è stato ottenuto lo standard di *cis*-resveratrolo come descritto nello stesso paragrafo 4.4.

Gli standard di *trans*-piceide (*trans*-3,5,4'-diidrossistilbene-3-*O*- $\beta$ -D-glucopiranoside) e *trans*-resveratroloside (*trans*-3,5,4'-diidrossistilbene-4'-*O*- $\beta$ -D-glucopiranoside) sono stati estratti da radici di *Polygonum cuspidatum* modificando il protocollo descritto da Waterhouse e Lamuela-Raventós (1994). Da 1 g di radici tritate ed omogenate con 50 mL di metanolo 100 % è stato ottenuto un estratto grezzo, che è stato filtrato e concentrato in rotavapor e sono stati eliminati i composti lipidici mediante un lavaggio con etere di petrolio. La fase acquosa è stata portata a secco in rotavapor, risospesa in 20 mL acqua MilliQ e portata a pH 7,0. Per eliminare il resveratrolo è stata lavata con 20 mL di etile acetato. La fase acquosa è stata evaporata per rimuovere i residui di etile acetato e centrifugata per togliere eventuali residui insolubili. La soluzione è stata purificata tramite una colonnina con resina C18 (Sep-Pak Plus, Waters Ltd., UK), da cui piceide e resveratroloside sono stati eluiti contemporaneamente con acetonitrile 16 % (v/v) in HCl 0,1 % (v/v). I due composti così ottenuti hanno lo spettro d'assorbimento uguale al *trans*-resveratrolo e la loro identità è stata confermata per

comparazione con standard di *trans*-piceide e *trans*-resveratroloside gentilmente forniti dal Prof. Luigi Bavaresco (Università Cattolica del Sacro Cuore, Piacenza, Italia).

Le forme *cis* dei 2 stilbeni glucosilati sono state ottenute irradiando la soluzione dell'isomero *trans* a 254 nm (UV) per 30 (piceide) o 60 minuti (resveratroloside), riadattando la metodica descritta da Goldberg *et al.* (1995) per il resveratrolo. Come per l'aglicone, la conversione *trans-cis* non è completa: occorre calcolare la percentuale di forma *trans* residua. Gli standard degli isomeri *cis* sono maggiormente soggetti a degradazione rispetto ai *trans*.

Lo standard del calcone (2',4,4',6'-tetraidrossicalcone) è stato preparato come descritto da Moustafa e Wong (1966) a partire da naringenina (Sigma). Non essendo idrosolubile, la naringenina è stata risospesa in KOH 50 % (v/w) e poi è stato aggiunto etanolo goccia a goccia fino al suo completo discioglimento. La soluzione è stata scaldata a 100°C per 2 minuti e poi posta in ghiaccio ed acidificata molto lentamente con HCl 6N. Intorno a pH 1-2 comincia a formarsi un precipitato giallo, il calcone, che è stato filtrato e corso in HPLC, osservando la presenza di due picchi principali, la naringenina di partenza ed il calcone neoformato. Moustafa e Wong consigliano di purificare ulteriormente il composto, ma essendo il calcone molto instabile abbiamo riscontrato l'avvenire della reazione inversa che ha riformato la naringenina. Quindi il passaggio di purificazione non è stato eseguito. A causa di difficoltà tecniche, non è stato possibile quantificare il calcone prodotto e quindi i risultati riferiti alla presenza del composto nei campioni sono espressi come aree dei picchi cromatografici e non in nmol.

Tutte le soluzioni degli standard sono conservate a -20°C ed al buio.

#### **4.10 Analisi cromatografica (metodo 2)**

Diverse migliorie sono state apportate a strumentazione e protocollo rispetto al metodo 1. A questo proposito un aiuto prezioso è stato dato dal Prof. Peter J. Davies, Cornell University, Ithaca, NY, USA, durante un soggiorno di 3 mesi presso l'Università di Bologna.

L'apparato HPLC è stato implementato di un forno per colonne (Eldex Column Heater CH-150; Eldex Laboratories Inc., Mapa, CA, USA) che ha permesso di ottenere tempi di ritenzione dei composti molto stabili e, in generale, cromatogrammi molto più riproducibili.

Il rivelatore UV/visibile è stato sostituito da un rivelatore a fotodiodi (diode array detector DAD; Jasco MD-2010 Plus Multiwavelength Detector). Con questo strumento è possibile conoscere lo spettro di assorbimento di ogni composto in uscita dalla colonna, così il riconoscimento delle sostanze non è fatto solo sulla base del tempo di ritenzione, ma anche



per confronto dell'intero spettro con quello dello standard, evitando fra l'altro la necessità di ricorrere a mix di standard e campione. Inoltre non occorre iniettare il campione una volta per ogni lunghezza d'onda a cui lo si vuole analizzare perchè tutte le lunghezze d'onda sono prese in esame contemporaneamente con una sola iniezione. Questo ha permesso di ridurre i tempi di lavoro e di allargare grandemente lo spettro dei composti analizzati.

Le migliorie alle metodologie hanno riguardato, oltre al protocollo di estrazione, la scelta degli eluenti ed il gradiente. Al posto del tampone fosfato 0,02 M si è utilizzata acqua acidulata (acqua Plus per HPLC (Merck, Whitehouse Station, NJ, USA) con acido acetico 0,02 % (v/v)), eliminando così il sale dal sistema. Inoltre è stato messo a punto un nuovo gradiente che ha permesso di separare molti più composti (vedi paragrafo 4.9) ed a cui si è aggiunta una fase finale di lavaggio (acetonitrile 100 % per 2 minuti) per evitare il possibile intasamento della colonna. Il flusso è stato mantenuto costante a 1,0 mL/min ed il gradiente utilizzato è il seguente:

Tempo (min)	% acetonitrile	% acqua acidulata
0	9	91
3	9	91
8	14	86
10	16	84
13	20	80
17	37	63
24	37	63
27	100	0
29	100	0
33	9	91
37	9	91

#### **4.11 Determinazione del contenuto di resveratrolo e di altri composti (metodo 2)**

Dal confronto dei tempi di ritenzione e degli spettri con quelli degli standard, sono stati riconosciuti in ogni cromatogramma i picchi di 24 composti (vedi paragrafo 4.9). Dall'area sottesa ad ogni picco è possibile quantificare il contenuto di quella sostanza nel campione con una semplice proporzione, tenendo conto dei fattori di diluizione e della concentrazione dello standard.

## 5. QUANTIFICAZIONE DEGLI ANTOCIANI TOTALI

Gli antociani non sono stati analizzati come singoli composti tramite HPLC, ma ne è stato quantificato il totale tramite analisi spettrofotometrica.

### 5.1 Estrazione e quantificazione degli antociani

Gli antociani sono stati estratti da campioni di cellule. Circa 0,5 g di cellule sono stati risospesi in 4 mL di soluzione di estrazione composta al 98 % (v/v) da metanolo e al 2 % (v/v) da HCl 12 N. Dopo 2 ore di incubazione a 65°C i campioni sono stati centrifugati per 10 minuti a 4500g a temperatura ambiente. Il sovranatante così ottenuto contiene gli antociani.

Il contenuto di antociani totali è stato misurato tramite analisi spettrofotometrica (Jasco 7800 UV/VIS Spectrophotometer). E' stata misurata l'assorbanza (Abs) dei surnatanti ottenuti dai campioni di cellule a 530 nm e a 657 nm e poi si è applicata la seguente formula:

$$\Delta Abs_{\text{antociani}} = Abs_{530} - (0.25 \cdot Abs_{657})$$

In questo modo si ottiene l'assorbanza degli antociani corretta per gli eventuali prodotti di degradazione delle clorofille, come le feofitine (Serafini-Fracassini *et al.*, 2002).

## 6. ANALISI PROTEOMICHE

Sono state eseguite analisi di "Expression Proteomic", cioè di proteomica di espressione, che è definita come lo studio della differenza di espressione fra due popolazioni proteiche. È stato seguito lo schema operativo classico: preparazione del campione, 1<sup>a</sup> dimensione IEF (IsoElectric Focusing), 2<sup>a</sup> dimensione SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulphate - PolyAcrylamide Gel Electrophoresis), colorazione del gel, acquisizione e analisi d'immagine, prelevamento dello spot dal gel, digestione con tripsina, spettrometria di massa.

Le analisi di spettrometria di massa sono state svolte in Inghilterra presso il John Innes Centre (IFR & JIC Joint Proteomics Facility, Department of Biological Chemistry, Norwich Research Park, Colney Lane, Norwich, NR4 7UH, GB), laboratorio del Dr Mike Naldrett, in 2 tempi: nell'aprile-luglio 2005 e poi nell'aprile-agosto 2007. Nel primo caso sono stati utilizzati estratti proteici totali di cellule al quarto giorno (giorno di massima produzione di resveratrolo) di colture non trattate, addizionate di acido acetico 0,01 % ed elicitate con 50 µg/mL di chitosano. Nel secondo caso, oltre a ripetere per conferma gli esperimenti del 2005, sono state analizzate frazioni subcellulari ottenute dagli stessi campioni. Il secondo soggiorno

trascorso in Inghilterra è stato finanziato con una borsa del Programma Marco Polo, Università di Bologna.

Di ogni campione sono state analizzate due repliche biologiche con due replicati tecnici, per un totale di quattro gel per ogni campione di cellule.

## 6.1 Soluzioni necessarie

Per il frazionamento delle cellule è necessario:

### Tampone di frazionamento:

100 mM	Tris-HCl pH 7
250 mM	saccarosio
2 mM	EDTA
0,5 mM	PMSF (da aggiungere al momento dell'uso)
0,1 mM	ditiotreitolo (DTT) (da aggiungere al momento dell'uso)

Per l'elettroforesi bidimensionale sono necessari:

### Tampone di reidratazione:

2 %	3-[(3-Colamidopropil)dimetilammonio]-1-propansulfonato (CHAPS)
7 M	urea
2 M	tiourea
1 %	IPG buffer pH 3-10 (Amersham Bioscience, Chalfont St.Giles, UK)
portare a volume con acqua MilliQ	
congelare in aliquote	
9 mg/mL	DTT (da aggiungere al momento dell'uso)

### Tris-HCl 1,5M:

130,8 g/L	Tris base
66,4 g/L	Tris HCl
portare a pH 8,0	
portare a volume con acqua MilliQ	

### Tris-acetato 0,112 M:

13,55 g/L	Tris base
3,2 mL/L	acido acetico
portare a volume con acqua MilliQ	

### Tampone "Tris-acetato":

0,112 M	Tris acetato
5 %	SDS
0,01 %	blu di bromofenolo

portare a volume con acqua MilliQ  
pH 7 (con acido acetico o NaOH)  
congelare in aliquote

Tampone di equilibrizzazione per 2<sup>a</sup> dimensione (SDS-PAGE):

560 mL/L	Tris acetato
5 g/L	SDS
360,3 g/L	urea
300 mL/L	glicerolo

portare a volume con acqua MilliQ  
Lasciare sciogliere per una notte in camera fredda  
congelare in aliquote

Tampone “bottom running buffer” 20X:

60,6 g/L	Tris base
16,2 mL/L	acido acetico

portare a volume con acqua MilliQ  
conservare in frigorifero

Tampone “top running buffer” 5X:

121 g/L	Tris base
20 g/L	SDS
100 g/L	tricina

portare a volume con acqua MilliQ  
conservare in frigorifero

Soluzione di fissaggio:

40 %	metanolo
10 %	acido acetico

portare a volume con acqua MilliQ

Comassie Blue (soluzione colorante):

2,5 g/L	Brilliant Blue R250
45 %	metanolo
10 %	acido acetico

portare a volume con acqua MilliQ  
Lasciare sciogliere per qualche ora  
Filtrare con carta da banco

Soluzione decolorante per Comassie Blue:

40 %	metanolo
10 %	acido acetico

portare a volume con acqua MilliQ  
È possibile filtrare la soluzione usata con carbone attivo per riutilizzarla più volte

## **6.2 Frazionamento delle cellule**

Allo scopo di evitare la rapida degradazione delle proteine è necessario che le cellule siano congelate in azoto liquido non appena campionate, polverizzate in mortai di ceramica mantenendole costantemente congelate con azoto liquido e conservate a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Per separare le frazioni subcellulari da cui poi estrarre le proteine, occorre sottoporre i campioni polverizzati ad una serie di centrifugazioni successive.

Le polveri congelate vengono omogenate in potter di vetro nel tampone di frazionamento a cui vanno aggiunti al momento PMSF (inibitore delle proteasi) e DTT (agente riducente). Con un filtro di nylon si eliminano i detriti cellulari di dimensioni maggiori, poi con una centrifugazione a 4400g (centrifuga Beckman J2-HS, rotore JA-20, Beckman Coulter Inc., Fullerton, CA, USA) e a  $4^{\circ}\text{C}$  per 25 min si ottiene il primo frazionamento. Il pellet contiene le pareti, o nuclei e vari tipi di organelli cellulari e può essere conservato a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Se si vuole lavorare sulla frazione di parete questa va purificata. Il sopranatante viene sottoposto ad ultracentrifugazione (Beckman Optima LE-80K Ultracentrifuge, Beckman Coulter Inc., Fullerton, CA, USA) per 1 ora a 100000g a  $4^{\circ}\text{C}$  per ottenere un pellet che contiene le membrane cellulari, mentre il surnatante ha in sospensione le proteine solubili. Le tre frazioni così separate vanno poi estratte e purificate singolarmente. In particolare la frazione di membrana, prima dell'estrazione con TCA (si veda il paragrafo 6.3), va risospesa in 3 mL di tampone di frazionamento e nuovamente omogenata in un potter di vetro, mentre per la frazione di parete è necessaria una sonicazione per staccare gli eventuali residui di membrana.

## **6.3 Estrazione delle proteine**

E' stato utilizzato lo stesso procedimento di estrazione delle proteine sia a partire da polveri di cellule totali (circa 10 g di peso fresco), sia da frazioni subcellulari (ottenute a partire da circa 10 g di cellule). Il campione viene posto in un tubo da centrifuga e le proteine sono precipitate utilizzando acido tricloro-acetico (TCA) in concentrazione finale del 25 % (w/v) (cioè a 10 g di cellule aggiungere 10 mL di TCA 50 %) incubando per almeno 1 ora in ghiaccio, e centrifugando per 45 min a  $4^{\circ}\text{C}$  a 23700g (centrifuga Beckman J2-HS, rotore JA-20, Beckman Coulter Inc., Fullerton, CA, USA). Lavare per almeno 3 volte il pellet in 3 volumi (cioè in un volume pari a 3 volte il volume del campione di partenza) di acetone 100 % tenuto a  $4^{\circ}\text{C}$ , incubando in ghiaccio per 45 min e centrifugando per 45 min a  $4^{\circ}\text{C}$  a 20400g. Quando l'acetone rimane pulito, lavare una volta con 2 volumi di etere etilico centrifugando per 10 min a  $4^{\circ}\text{C}$  a 1000g, e far asciugare il pellet all'aria per 30 min. Trasferire in eppendorf la

polvere così ottenuta e risospenderla in fenolo liquido a pH 7,9 a cui è stato addizionato l'1 % (v/v) di  $\beta$ -mecaptoetanolo (per ridurre i ponti disolfuro), secondo la proporzione 30 mg polvere : 1,3 mL fenolo. Incubare per almeno 6 ore a temperatura ambiente, poi centrifugare per 30 min a 20000g a 8°C (a temperature inferiori il fenolo precipita). Prelevato il surnatante, portare ad un volume di 500  $\mu$ L con fenolo liquido pH 7,9 ed estrarre con 500  $\mu$ L di Tris-HCl 50 mM pH 8 con SDS 1 % (w/v). Tramite centrifugazione per 6 min a 11400g a temperatura ambiente si separano 2 fasi: rimuovere quella acquosa. Ripetere altre 2 volte l'estrazione della fase fenolica con 400  $\mu$ L di Tris-HCl 50 mM pH 8 con 1 % di SDS. Precipitare con 1,3 mL di acetone per almeno 2 ore a 4°C. Centrifugare per 30 min a 20000g a 8°C, lavare 2 volte il pellet con 1,3 mL acetone e 1 volta con 1 mL di etere dietilico, asciugare all'aria per 10 min e risospendere in 500  $\mu$ L di tampone di reidratazione. Dopo una notte di incubazione a 4°C, i campioni di proteine possono essere caricati sulla striscia di gel per isofocalizzazione od essere conservati a -80°C. In questo secondo caso, il tampone di reidratazione non deve contenere l'IPG buffer, che andrà aggiunto al momento dell'isofocalizzazione (1<sup>a</sup> dimensione elettroforetica).

Può essere utile quantificare le proteine estratte, utilizzando un metodo spettrofotometrico come il Bradford (Bradford, 1976) o il Lowry (Lowry *et al.*, 1951).

#### **6.4 Elettroforesi bidimensionale**

Prima dell'elettroforesi bidimensionale, il campione di proteine è stato centrifugato per 15-30 minuti a 20000g a 8°C (a temperature minori precipita l'urea). Al surnatante sono stati addizionati 2  $\mu$ L di una soluzione satura di blu di bromofenolo in acqua, colorante, altri 4-7  $\mu$ L di DTT 400 mg/mL (2  $\mu$ L ogni 100  $\mu$ L di campione), agente riducente, e l'1 % di IPG buffer pH 3-10 (Amersham Bioscience, Chalfont St.Giles, UK), miscela di anfoliti (sostanze che in ambiente acquoso possono comportarsi sia da acido che da base a seconda del pH; in questo caso favoriscono la solubilizzazione e la migrazione delle proteine).

Fra i 300 e i 700  $\mu$ g di proteine sono stati caricati per l'isofocalizzazione su strisce di gel di poliacrilammide disidratato polimerizzato su supporto plastico Immobiline DryStrip pH 3-10 NL (non lineare) (Amersham Bioscience, Chalfont St.Giles, UK) lunghe 18 cm. Sono stati lasciati in incubazione a 18-20°C per una notte, coperti da olio minerale per impedire l'evaporazione del tampone e la conseguente precipitazione dell'urea. Si tratta di una reidratazione passiva, cioè in assenza di una differenza di potenziale elettrico, durante la quale la striscia di gel assorbe tutto il tampone che contiene il campione e gli anfoliti.

Segue la isofocalizzazione vera e propria, durante la quale le proteine si separano secondo il loro punto isoelettrico (PI), cioè il pH a cui la proteina non ha carica netta. La striscia di gel è stata posta in un isoelettrofocalizzatore con due piccoli pezzi di carta assorbente umida di acqua MilliQ fra il gel e gli elettrodi per favorire il contatto. Per i gel dei campioni analizzati nel 2005 è stato utilizzato un pHaser con blocco refrigerante (Genomic Solutions, Huntingdon, UK), mentre per i campioni del 2007 un Protean IEF Cell (BioRad Laboratories, Hercules, USA). Il programma per l'isofocalizzazione prevede un totale di 85 KVh in un periodo di 24 ore, a 20 °C, secondo i seguenti passaggi: 15 min a 250 V, 1h a 500 V, 1h a 1000 V, 5h a 8000 V, 4h a 10000 V, poi a 500 V. Al termine del programma le strisce di gel possono essere conservate a -80°C o riequilibrate e corse lungo la seconda dimensione.

Per la separazione elettroforetica delle proteine secondo il peso molecolare (SDS-PAGE, seconda dimensione elettroforetica), occorre preparare un gel di acrilammide largo quanto è lunga la striscia di gel della 1<sup>a</sup> dimensione (18 cm, gel da 55 mL). La sua preparazione prevede di miscelare 21,18 mL di acqua MilliQ con 13,75 mL di Tris-HCl 1,5 M, 0,55 mL di SDS 10 % (w/v) e 18,15 mL di una soluzione 29:1 di acrilammide/bis acrilammide al 30 %; filtrare con filtri da 0,45 µm (Millex GP, Millipore, Carrigtwohill, Co. Cork, Ireland); aggiungere 1,375 mL di APS (ammonio persolfato) 10 % (w/v) (agente polimerizzante) e 27,5 µL di Temed (N,N,N',N'-tetrametil-etilenediammina, accelerante della polimerizzazione) e versare immediatamente tra i 2 vetri della camera; coprire con butanolo saturo di acqua o con isopropanolo e lasciare polimerizzare. Una volta solidificato può essere conservato a 4°C parzialmente immerso in Tris-HCl 0,75 M pH 8,8.

Prima di essere usata per la seconda dimensione, la striscia di gel isofocalizzata è stata riequilibrata in agitazione per 30 minuti nel tampone di equilibratura per 2<sup>a</sup> dimensione a cui è stato aggiunto fresco lo 0,8 % (w/v) di DTT, e poi per altri 30 minuti nello stesso tampone con il 2,5 % (w/v) di iodoacetammide fresca. Entrambi i tamponi devono essere filtrati (filtri da 0,45 µm, Millex GP, Millipore, Carrigtwohill, Co. Cork, Ireland) prima di essere utilizzati.

Il gel di acrilammide è stato montato in verticale nella cella di corsa; il pozzetto e lo spazio interno fra le camere è stato riempito con "top running buffer" 1X ed è stata caricata la striscia di gel isofocalizzata e riequilibrata. Per fissare la striscia al gel si è aggiunto agarosio 0,5 % (w/v) fino al riempire il pozzetto. Il "bottom running buffer" 1X è stato versato fino a metà altezza nello spazio esterno della camera di corsa. Per i campioni del 2005 è stato utilizzato Investigator 2-D large format 5-gel electrophoresis tank (Genomic Solutions, Huntingdon, UK) a 20 V per gel, a 20°C, per 4-5 ore. Per i campioni analizzati nel 2007 è stata usata una

cella BioRad per 2 gel e la corsa è stata eseguita in 4 fasi con corrente elettrica decrescente: 2h a 100 mA/gel, 1h 30' a 90 mA, 1h 30' a 80 mA, 2h a 70 mA. In entrambi i casi la corsa è stata fermata quando il fronte blu del colorante era a circa 2 cm dal fondo del gel.

I gel bidimensionali sono stati fissati con la soluzione di fissaggio per almeno 1 ora.

## **6.5 Colorazioni dei gel**

I gel dei campioni di estratti proteici totali del 2005 sono stati colorati con Sypro Ruby fluorescent dye (BioRad Laboratories, Hercules, USA), un colorante fluorescente che visualizza tutte le proteine, secondo le istruzioni del produttore, per 12 ore. E' seguito un lavaggio di 1 ora in metanolo 10 % (v/v) e acido acetico 6 % (v/v).

I gel dei campioni di estratti proteici totali del 2007, invece, sono stati sottoposti a due colorazioni successive, la prima con Pro-Q Diamond phosphoprotein dye (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) e la seconda con Sypro Ruby. La colorazione con Pro-Q Diamond, fatta secondo le istruzioni del produttore, è specifica per le fosfoproteine ed è stata eseguita per identificare il grado di fosforilazione delle STS. Lo stesso gel è stato successivamente colorato con Sypro Ruby, come per i gel del 2005, per visualizzare tutte le proteine presenti. Per ogni spot, il rapporto fra le intensità del segnale del Pro-Q Diamond e del Sypro Ruby è stato determinato per ottenere il livello di fosforilazione di quella proteina normalizzato per la sua quantità.

I gel dei campioni di estratti proteici di frazioni subcellulari sono stati colorati con Comassie Blue, un colorante che marca tutte le proteine; ha una sensibilità minore del Sypro Ruby ma è osservabile nel visibile. Il gel va immerso nella soluzione colorante per alcune ore, in lenta agitazione a temperatura ambiente, e poi nella soluzione decolorante fino alla visualizzazione degli spot, sostituendo più volte la soluzione.

## **6.6 Analisi delle immagini dei gel**

Al termine della colorazione, per ciascun gel è stata fatta un'acquisizione digitale dell'immagine a cui ha fatto seguito l'analisi di densitometria ed i confronti fra trattato e controlli e fra i due controlli.

Le immagini dei gel dei campioni di estratti proteici totali del 2005 sono stati acquisiti mediante un ProExpress multiwavelength fluoroimager (Perkin Elmer Lifesciences, Cambridge, UK), mentre nel 2007 è stato utilizzato un PharosFX Molecular Imager (BioRad Laboratories, Hercules, USA).



Le immagini dei gel trattati col colorante fluorescente Sypro Ruby sono state acquisite con una sorgente laser ed un rivelatore UV, avendo tale colorante i massimi di eccitazione ed emissione a 280 e 450/610 nm. Per le colorazioni con Pro-Q Diamond e con Comassie Blue, invece, è stata utilizzata una strumentazione per luce visibile, in quanto i massimi dei due coloranti sono rispettivamente a 555/580 nm e 595 nm.

Tutte le immagini dei gel sono state analizzate con il programma ProteomWeaver (versione 2.1 nel 2005, Definiens Ag, Munich, Germania; versione 4.0 nel 2007, BioRad Laboratories, Hercules, USA), che consente di individuare e quantificare gli spot di un gel e di confrontare immagini di esperimenti diversi.

Per le successive analisi di spettrometria di massa sono state prese in considerazione solo gli spot di proteine (identificati con Sypro Ruby o con Comassie Blue) che mostravano un'intensità di almeno 2 volte più alta o più bassa nel confronto fra i campioni trattati e i controlli o fra i due controlli. Il valore preso in considerazione era l'intensità media calcolata fra le repliche dello stesso campione.

## **6.7 Spettrometria di massa**

Tutte le analisi di spettrometria di massa sono state svolte presso il John Innes Center - IFR & JIC Joint Proteomics Facility, Department of Biological Chemistry, Norwich, GB, laboratorio del Dr Mike Naldrett.

Le proteine la cui intensità dello spot (intesa come media fra i replicati) era almeno 2 volte maggiore o minore nel campione trattato rispetto ad un controllo o fra i due controlli, sono state tagliate dal gel, digerite con tripsina ed analizzate con tecniche di spettrometria di massa.

Le proteine provenienti dagli estratti totali di cellule del 2005 sono state prelevate con un Investigator ProPic spot picker (Genomic Solutions, Huntingdon, UK) e digerite con tripsina in un ProGest in gel digestion unit (Genomic Solutions, Huntingdon, UK), come descritto da Speicher *et al.* (2000). Le proteine delle frazioni subcellulari (analisi del 2007) sono state tagliate manualmente dai gel e poi digerite secondo il seguente protocollo. Lavare il frammento di gel 2 volte per 20 min con 100 µL di carbonato di ammonio (ABC) 200 mM in acetonitrile 50 % (v/v); asciugare; aggiungere 100 µL di DTT 10 mM in ABC 50 mM ed incubare per 30 min a 60°C; sostituire il tampone con 100 µL di iodoacetammide 100 mM in ABC 50 mM ed incubare per 30 min al buio a temperatura ambiente; lavare 2 volte per 20 min con 100 µL di ABC 200 mM in acetonitrile 50 % (v/v); fare disidratare il frammento di gel per 15 min in 100 µL di acetonitrile 100 %; asciugare all'aria; aggiungere 50 ng di tripsina

(Promega Corporation, Madison, WI, USA) risospesa in 5  $\mu$ L di ABC 10 mM; incubare a 37°C per 5 ore; aggiungere 5  $\mu$ L di acido formico 5 %; lasciare per 10-15 a temperatura ambiente e poi deporre sulla piastra PAC (AnchorChip plate per MALDI) o congelare in azoto liquido e conservare a -80°C fino al momento dell'analisi.

Per l'identificazione delle proteine si è utilizzata la tecnica di spettrometria di massa MALDI-ToF (matrix-assisted laser desorption/ionization - time of flight) e, solo per i campioni non identificati in questo modo, si è passati a tecniche più complesse quali MALDI-MSMS, LC-ESI-Q-ToF (liquid chromatography - electron spray ionization - quadrupole - time of flight) e *de novo* sequencing (DNVS).

Nelle analisi su estratti proteici totali eseguite nel 2005, per la deposizione dei campioni sulla piastra per il MALDI si è utilizzata la metodologia "dry-droplet". Sulla apposita piastra di acciaio sono state poste gocce di una matrice ottenuta mescolando tre parti di una soluzione satura di acido  $\alpha$ -ciano-4-idrossicinnamico (CCA) in acetone con una parte di una miscela di 1:1 di acetone:isopropanolo contenente 10 mg/mL di nitrocellulosa. Una volta evaporato il solvente rimangono piccoli cerchi di un sottile strato di matrice sui quali possono essere depositi i campioni digeriti con tripsina. È stata eseguita una calibrazione esterna per migliorare l'accuratezza di misura della massa fino a 50 ppm.

Nelle analisi su estratti proteici da frazioni subcellulari eseguite nel 2007, invece, i campioni digeriti con tripsina sono stati direttamente depositi su una piastra pre-spotted AnchorChip plate (PAC) (Bruker Daltonik GmbH, Leipzig, Germania), secondo le istruzioni del fornitore. È stata eseguita una calibrazione interna basata sui peptidi generati dall'autoproteolisi della tripsina.

In entrambi i casi, le analisi dei peptidi sono state effettuate su un Reflex III MALDI-ToF (Bruker Ltd, Coventry, GB) con una sorgente di ioni Scout 384 provvista di laser all'azoto ( $\lambda=337$  nm) per desorbire/ionizzare la matrice con il campione. Gli ioni generati in questo modo vengono accelerati da un potenziale di +25 kV e l'analizzatore a tempo di volo (ToF), funzionante in modalità "reflectron", misura il tempo che ciascuno ione impiega a percorrere il tragitto fra la sorgente ed il rivelatore. Poiché tutti gli ioni possiedono la stessa energia cinetica, il tempo impiegato da ciascuno di essi è esclusivamente funzione del suo rapporto massa/carica ( $m/z$ ). Il profilo dei peptidi di ogni campione (cioè di una proteina digerita con tripsina) è caratteristico della proteina di partenza ed è detto "fingerprint". I "peptide fingerprints" così ottenuti sono stati confrontati con la banca dati SPTreMBL (UNIPROT) dell'NCBI (National Center for Biotechnology Information), aggiornata settimanalmente e non ridondante. È stato utilizzato l'algoritmo di ricerca Mascot Peptide Mass Fingerprint

(Matrix Science Ltd., London, UK, <http://www.matrixscience.com>) con impostati i seguenti parametri: ossidazione della metionina e carboamidometilazione della cisteina come modificazioni variabili, 50 ppm di tolleranza sulla massa, 1 possibile taglio mancato (missed cleavages), massa monoisotopica  $MH^+$ , tassonomia *Viridiplantae*.

I campioni non identificati con MALDI-ToF, sono stati analizzati con lo stesso strumento nella modalità MALDI-MSMS, cioè i migliori peptidi generati dalla tripsina sono stati ulteriormente frazionati e l'analisi ToF è stata ripetuta sui frammenti. La ricerca in banca dati è stata eseguita con Mascot in modalità MSMS, con 2 missed cleavages e 700 mmu (=0,7 Da) di tolleranza MSMS sulla massa.

Le proteine digerite con tripsina ancora non identificate sono state usate per effettuare analisi Q-ToF. Le soluzioni contenenti i peptidi triptici sono state addizionate di 25  $\mu$ L di acido trifluoroacetico (TFA) 0,1 % (v/v) e dopo 10-15 di incubazione a temperatura ambiente sono state deposte sulla piastra a pozzetti del Q-ToF e caricate con flusso alto su una colonna a fase inversa (0.3mm i.d. x 1mm, contenente 5 $\mu$ m C18 100 Å PepMap packing, LC Packings, Paesi Bassi) ed eluiti attraverso una colonna capillare a fase inversa (75 $\mu$ m i.d. x 150mm column, contenente Symmetry C18 300 Å packing, Waters Ltd., UK) direttamente nella fonte di ioni nano-electrospray di uno spettrometro di massa a quadrupolo-ToF (Q-ToF2, Micromass UK Ltd., Manchester, GB). Gli spettri dei frammenti ionici sono stati analizzati mediante il programma Mascot MS/MS Ions Search tool (Matrix Science Ltd., London, UK) utilizzando la banca dati SPTreMBL (UNIPROT), aggiornata settimanalmente, e l'algoritmo di ricerca Mascot MSMS Ion Search (Matrix Science Ltd., London, UK, <http://www.matrixscience.com>), con i seguenti parametri: tolleranza MS 50 ppm, tolleranza MSMS 200 mmu (=0.2 Da), carica dei peptidi +2 e +3, tassonomia *Viridiplantae*.

I peptidi che non sono stati identificati tramite la ricerca in banca dati, sono stati sequenziati *de novo* (DNVS) usando il programma PepSeq software (Micromass, Manchester, GB).

Le analisi sono state ripetute almeno 2 volte per ogni spot.

## **7. ANALISI TRASCRIZIONALI TRAMITE NORTHERN BLOT**

Le analisi di northern blot si basano sulla proprietà degli acidi nucleici di essere carichi negativamente ed in modo costante per unità di massa e quindi sulla loro capacità di muoversi, quando sottoposti ad un campo elettrico, verso il catodo con una velocità inversamente proporzionale alla sua massa, mentre la distanza percorsa in un dato tempo

dipende dal logaritmo della sua lunghezza. In questo modo il northern blot separa molecole di RNA di lunghezza diversa mediante elettroforesi su gel di agarosio in condizioni denaturanti (per mantenere aperti e separati i filamenti). L'efficienza della separazione è influenzata dalla concentrazione del gel ed il potere risolutivo dipende dal voltaggio applicato. Dopo la separazione elettroforetica, gli acidi nucleici vengono trasferiti su una membrana di nylon che è poi ibridata con una sonda marcata con  $^{32}\text{P}$  capace di legare una sequenza specifica di RNA messaggero. L'analisi dell'emissione di radioattività permette di stimare la quantità presente nel campione di quello specifico RNA. Analisi di questo tipo non sono quantitative in termini assoluti ma permettono di confrontare campioni ibridati sulla stessa membrana. Inoltre danno informazioni sulla quantità di RNA presente ma non sulla sua origine, quindi un aumento osservato può essere dovuto a neo-sintesi o ad un incremento di stabilità.

Per l'analisi trascrizionale sono stati utilizzati i campioni di RNA estratti da ogni giorno di time course da cellule di picciolo di Barbera non trattate, elicitate con chitosano 50  $\mu\text{g/mL}$  ed addizionate del solo acido acetico 0,01 %. Su di essi sono state eseguite analisi di northern blot ibridando con sonde specifiche per gli RNA messaggeri di stilbene sintasi (STS), calcione sintasi (CHS), calcione isomerasi (CHI), fenilalanina ammonio liasi (PAL), pathogenesis related proteins 10 (PR-10). Le sonde sono state amplificate a partire dal DNA estratto dalle stesse cellule.

Per l'estrazione ed il successivo utilizzo degli acidi nucleici occorre prendere le adeguate precauzioni per evitare contaminazioni con acidi nucleici esogeni o degradare (DNAasi, RNAasi) il campione. Bisogna, quindi, indossare sempre guanti sterilizzati con etanolo 70 %, adoperare materiale plastico e vetreria autoclavato o sterilizzato con etanolo, utilizzare acqua MilliQ sterile e punte col filtro.

## **7.1 Soluzioni necessarie**

Per l'estrazione degli acidi nucleici è necessario avere a disposizione, oltre all'etanolo 70 % (v/v) per sterilizzare tutto il materiale utilizzato, una scorta di etanolo 100 % e di acqua MilliQ sterile (autoclavata a 120°C e 1,0 atm per 20 minuti), del  $\beta$ -mercaptoetanolo e le soluzioni qui di seguito elencate:

Cloroformio/isoamilalcol 24:1

Prepararlo sotto cappa chimica e non autoclavare.

Tampone di estrazione:

100 mM	Tris-HCl, pH 8
25 mM	EDTA, pH 8
2 M	NaCl
2 %	polivinilpirrolidone (PVP-40)
2 %	bromuro di esadecil-trimetil-ammonio (CTA(B))

portare a volume con acqua MilliQ

autoclavare a 120°C e 1,0 atm per 20 minuti

Da preparare direttamente in una bottiglia di vetro tarata perchè a freddo non si solubilizza completamente.

Agitare prima dell'uso.

LiCl 10M:

Pesare 42,39 g di LiCl in una bottiglia di vetro tarata e portare a 100 mL con acqua MilliQ. Lasciare in agitazione fino al completo discioglimento e poi autoclavare.

Attenzione: reazione altamente esotermica.

Na-acetato 3M, pH 5,2:

Pesare 24,609 g di Na-acetato; portare a 100 mL con acqua MilliQ; portare a pH 5-5,2; autoclavare a 120°C e 1,0 atm per 20 minuti.

Etanolo 70 % RNA-friendly:

Autoclavare 300 mL di acqua MilliQ in una bottiglia da 1L. Quando è tornata a temperatura ambiente aggiungere 700 mL di etanolo 100 %.

SSTE:

1 M	NaCl
0,5 %	SDS
10 mM	Tris-HCl, pH 8
1 mM	EDTA, pH 8

portare a volume con acqua MilliQ  
autoclavare a 120°C e 1,0 atm per 20 minuti

Per l'elettroforesi monodimensionale degli acidi nucleici è necessario avere a disposizione tampone, etidio bromuro 10 mg/mL, formaldeide e le soluzioni qui di seguito elencate:

TAE 50X (Tris/Acetate/EDTA):

242 g/L	Tris base
57,1 mL	acido acetico glaciale
100 mL	EDTA 0,5M (pH 8,0)

portare a volume con acqua MilliQ

TBE 10X (Tris/Borate/EDTA):

108 g/L	Tris base
55 g/L	acido borico
9,3 g/L	Na <sub>4</sub> EDTA

portare a volume con acqua MilliQ

Loading Dye 5X:

0,15 %	blu di bromofenolo
50 %	glicerolo
50 %	TBE 5X

MOPS 10X:

4,12 g/L	NaCl
2,92 g/L	EDTA

951 mL/L acqua MilliQ  
autoclavare a 120°C e 1,0 atm per 20 minuti  
riportare a temperatura ambiente  
41,86 g/L MOPS  
portare a pH 7 con NaOH solido

MFF:

750 µL	Formammide
262,5 µL	Formaldeide
150 µL	MOPS 10X

Questa soluzione va preparata al momento dell'utilizzo e non può essere conservata.

Per l'analisi di northern blot è necessario preparare le seguenti soluzioni:

SSC 20X:

175 g/L	NaCl
88,2 g/L	Na-citrato

portare a pH 7  
portare a volume con acqua MilliQ  
autoclavare a 120°C e 1,0 atm per 20 minuti

SSPE 20X:

175,3 g/L	NaCl
27,6 g/L	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
7,4 g/L	EDTA

800 mL/L acqua MilliQ  
portare a pH 7,4 con NaOH solido  
portare a volume con acqua MilliQ  
autoclavare a 120°C e 1,0 atm per 20 minuti

#### Denhart 50X:

10 g/L	Ficoll
10 g/L	polivinilpirrolidone solubile (PVP)
10 g/L	albumina bovina (BSA)

portare a volume con acqua MilliQ

Filtrare e congelare in aliquote.

#### TE 1X:

Sciogliere 0,6055 g di Trisma base in 200 mL di acqua MilliQ.

Portare a pH 7,4 con HCl 6 N.

Aggiungere 1 mL di EDTA 0,5 M pH 8,0.

Portare a pH 7,4 con HCl 0,1 N.

Portare a 500 mL con acqua MilliQ.

#### DNA di sperma di salmone:

10 mg/mL in 0,1X TE.

Agitare per 2-4 ore.

Passare la soluzione più volte attraverso l'ago di una siringa fino a ridurre la viscosità e rompere il DNA in piccoli frammenti.

Bollire in agitazione per 10 minuti.

Misurare la concentrazione allo spettrofotometro ( $1 \text{ Abs}_{260} = 50 \mu\text{g/mL}$ ).

Con 3-5  $\mu\text{g}$  di DNA controllare su gel di agarosio 1 % che sia davvero frammentato: si deve vedere una strisciata <1kb.

Congelare in aliquote.

#### Soluzione di pre-ibridazione:

a volume	acqua MilliQ
50 %	Formammide
5 X	SSPE 20X
5 X	Denhart 50X
0,5 %	SDS 10 %
80 $\mu\text{g/mL}$ (in eccesso)	DNA di sperma di salmone bollito per 10 minuti (da aggiungere al momento dell'uso)

Non mettere in ghiaccio altrimenti l'SDS precipita.

## **7.2 Estrazione degli acidi nucleici**

Il protocollo di estrazione adottato non prevede l'utilizzo di kit e necessita di almeno 3 giorni di lavoro. Infatti, poiché la vite è una materia prima particolarmente difficile a causa della presenza di polifenoli e zuccheri, si è adattata allo scopo la metodica descritta da Chang *et al.* (1993).

Una volta raccolti, i campioni di cellule vanno congelati in azoto liquido, conservati a  $-80^{\circ}\text{C}$  o essere utilizzati subito. I campioni vanno polverizzati in un mortaio di ceramica mantenuto

freddo con azoto liquido. Anche a questo stadio possono essere conservati a -80°C o essere estratti immediatamente.

Prima di iniziare, il tampone di estrazione va riscaldato a 65°C, agitato, addizionato di  $\beta$ -mercaptoetanololo al 2 % (v/v) ed infine suddiviso in aliquote di 15 mL in tubi da centrifuga. I tubi vanno lasciati a 65°C per almeno 15 minuti prima di trasferirvi i campioni polverizzati, pesati ed ancora congelati. Dopo un passaggio in vortex per risospendere completamente la polvere, si lascia 2 minuti a 65°C prima di aggiungere 15 mL di cloroformio/isoamilalcol, vortexare di nuovo, e centrifugare per 20 minuti a 4°C e a 3000g (centrifuga Beckman J2-HS, rotore JA-20, Beckman Coulter Inc., Fullerton, CA, USA). La fase superiore, contenente gli acidi nucleici, viene trasferita in un tubo pulito, addizionata di 15 mL di cloroformio/isoamilalcol, vortexata e centrifugata nuovamente. Raccolta la fase superiore in un tubo da centrifuga pulito, si procede alla precipitazione dell'RNA addizionando 3,5 mL di LiCl 10 M, vortexando e lasciando sedimentare per una notte a 4°C.

Il giorno successivo i campioni vengono centrifugati a 12000g e 4°C per 30 minuti e poi separati il surnatante dal pellet: il DNA rimane in soluzione, mentre il LiCl fa precipitare l'RNA. I surnatanti contenenti il DNA possono essere conservati a 4°C.

L'estrazione dell'RNA prosegue quindi sui pellet, che vanno risospesi in 500  $\mu$ L di STE precedentemente riscaldato a 65°C e posti per 2 minuti a 65°C. Una volta trasferiti in eppendorf da 2 mL, vi vanno aggiunti 500  $\mu$ L di cloroformio/isoamilalcol. Dopo un passaggio in vortex, i campioni sono centrifugati a 6500g e 4°C per 10 minuti. Dalla fase superiore si precipita l'RNA addizionando 1 mL di etanolo 100 % e 50  $\mu$ L di Na-acetato 3M, mescolando per inversione e lasciando sedimentare per almeno una notte a -80°C. Dopo una centrifugata a 15000g e 4°C per 30 minuti, eliminare il surnatante, lavare il pellet, cioè l'RNA estratto, risospingendendolo in 200  $\mu$ L di etanolo 70 % RNA-friendly, centrifugandolo a 15000g e 4°C per 15 minuti e asciugandolo completamente. L'RNA va rispeso in 50  $\mu$ L di acqua MilliQ sterile e poi può essere conservato a -80°C. E' utile correrne una piccola aliquota su gel di agarosio 1 % (vedi paragrafo 7.4) per verificare la purezza e l'eventuale degradazione dell'acido nucleico estratto e per stimarne la concentrazione (per una quantificazione precisa occorre ricorrere ad una analisi spettrofotometrica: vedi paragrafo 7.3).

Dai surnatanti della centrifugata che ha seguito la precipitazione con LiCl, è possibile purificare il DNA ed allo stesso tempo recuperare l'RNA rimasto in sospensione.



Ai campioni conservati a 4°C aggiungere 2 volumi di etanolo 100 % e 1/10 di volume di Na-acetato 3M, mescolare per inversione e centrifugare a 1600g, a temperatura ambiente per 10 minuti. Il pellet va risospeso delicatamente in almeno 1 mL di etanolo 70 % RNA-friendly e nuovamente centrifugato. Questo lavaggio può essere ripetuto più volte. Far asciugare completamente il pellet e poi risospenderlo in 200 µL di acqua MilliQ sterile. La sospensione, trasferita in una eppendorf, va precipitata nuovamente con 1/4 di volume di LiCl 10 M e una notte a 4°C.

Centrifugando i campioni a 15000g e 4°C per 30 minuti è possibile separare il DNA (nel sovrantante) dall'RNA (precipitato).

Il surnatante va precipitato con 500 µL di etanolo 100 % e 25 µL di Na-acetato, centrifugandolo a 15000g e 4°C per 30 minuti.

Sui pellet ottenuti da entrambe le centrifugate (uno contenente RNA e uno DNA) si procede con un lavaggio con 200 µL di etanolo 70 % RNA-friendly. Il pellet finale va asciugato completamente e poi risospeso in 50 µL di acqua MilliQ sterile e poi può essere conservato a -80°C. E' utile correrne una piccola aliquota su gel di agarosio 1 % (vedi paragrafo 7.4).

### **7.3 Quantificazione degli acidi nucleici**

Una stima della concentrazione degli acidi nucleici estratti può essere fatta correndo un volume noto di campione in un gel di agarosio (vedi paragrafo 7.4) e confrontando la grandezza della banda ottenuta con quella dello standard corso sullo stesso gel.

Per una quantificazione accurata occorre ricorrere ad una analisi spettrofotometrica. Nel caso dell'RNA, il campione va adeguatamente diluito con acqua MilliQ sterile in una cuvetta di quarzo e la sua assorbanza va letta allo spettrofotometro alle lunghezze d'onda di 258 e 280 nm. A 258 nm l'RNA ha il suo picco di massimo assorbimento, mentre con la lettura a 280 nm si calcola l'eventuale contaminazione da proteine. Un campione sufficientemente puro ha il rapporto  $Abs_{258}/Abs_{280}$  pari a 1,8 (o comunque compreso fra 1,4 e 2,0). Sapendo che 1 unità di assorbanza a 258 nm corrisponde a 40 µg/mL e tenendo conto del fattore di diluizione, con una semplice proporzione si può quantificare l'RNA presente nel campione.

Per campioni di DNA il procedimento è analogo, ma sono necessarie letture spettrofotometriche a lunghezze d'onda diverse. A 260 nm il DNA ha il suo picco di massimo assorbimento ed 1 unità di assorbanza a 260 nm corrisponde a 50 µg/mL. Per verificare il grado di purezza la lettura deve essere fatta anche a 230, 280 e 320 nm. Analogamente a quanto avviene per i campioni di RNA, misurando l'assorbanza a 280 nm si considera

l'eventuale contaminazione da proteine: il rapporto  $Abs_{260}/Abs_{280}$  deve essere circa 1,8. L'assorbanza a 230 nm riflette la contaminazione dovuta a sostanze come carboidrati, fenoli, peptidi o composti aromatici; nel caso di campioni puri il rapporto  $Abs_{260}/Abs_{230}$  dovrebbe essere circa 2,2. Infine, con la lettura a 320 nm, si può correggere il fattore torbidità o le differenze tra cuvetta e cuvetta.

#### **7.4 Elettroforesi monodimensionale**

L'elettroforesi degli acidi nucleici è eseguita in gel di agarosio, generalmente all'1 % (w/v). Il gel viene preparato utilizzando il tampone TAE 1X per sciogliere la polvere di agarosio a caldo. Per un gel piccolo di controllo si utilizzano 0,5 g di agarosio e 50 mL di TAE, mentre è necessario almeno triplicare le dosi per un gel grande. Quando la soluzione si è raffreddata fino a circa 60°C va aggiunto etidio bromuro 10 mg/mL in proporzione 1:10000 e mescolato. La miscela va fatta polimerizzare direttamente nella vaschetta di corsa e con il pettine per pozzetti già in posizione. Quando il gel è solido, la vaschetta va inserita nella camera di corsa con i pozzetti verso il polo negativo (nero) e va ricoperta di TAE 1X. I campioni e lo standard vanno caricati nei pozzetti già addizionati con il loading dye. Quest'ultimo tampone contiene due coloranti di pesi molecolari diversi che permettono di seguire visivamente la corsa elettroforetica e facilitano la deposizione dei campioni nei pozzetti. I primi 5 minuti di corsa del gel richiedono un voltaggio di 120 V per permettere ai campioni di entrare velocemente nel gel, e poi si scende a 90 V, così da separare gli acidi nucleici secondo il peso molecolare (e quindi la lunghezza dei frammenti polinucleotidici). Terminata la corsa il gel va osservato al transilluminatore con luce UV di 365 nm e può essere utile fotografarlo.

L'analisi di northern blot richiede una prima fase molto delicata di elettroforesi monodimensionale per separare gli RNA messaggeri presenti nei campioni.

L'apparecchiatura da gel deve essere pulita per 2 ore con una soluzione di lavaggio contenente NaOH 0,2 M e SDS 1 % (w/v) e poi risciacquata abbondantemente con acqua MilliQ sterile.

Occorre utilizzare un gel grande (da 180 mL) all'1.2 % (w/v) di agarosio, denaturante, con una composizione ed una preparazione particolare:

12 g/L	Agarosio
100 mL/L	MOPS 10X
35 mL/L	Formaldeide
25 µL/L	etidio bromuro

portare a volume con acqua MilliQ

Far sciogliere a caldo l'agarosio in acqua MilliQ, agitare bene e lasciare raffreddare fino a circa 60°C; aggiungere (lavorando sotto cappa chimica) la miscela di MOPS e formaldeide a temperatura ambiente e continuare a mescolare. Aggiungere l'etidio bromuro e far solidificare nella vaschetta di corsa con il pettine per pozzetti inserito.

Prima di essere caricati nei pozzetti del gel, i campioni di RNA devono essere aliquotati e preparati. Per ottenere buoni risultati dall'analisi di northern blot, di tutti i campioni deve essere caricata la stessa quantità (circa 20 µg di RNA). Dai risultati ottenuti dalla quantificazione spettrofotometrica, si calcola il volume necessario di ogni campione. Se questo volume è superiore al volume del pozzetto, occorre riprecipitare l'RNA per concentrarlo: aggiungere 1/10 di volume di Na-acetato 3M e 2 volumi di etanolo 100 %; far sedimentare per 1 notte a -80°C; centrifugare alla massima velocità (20000g), a 4°C per 30 minuti; lavare il pellet almeno una volta con 200 µL di etanolo 70 % RNA-friendly e poi asciugarlo all'aria; risospendere l'RNA in 10 µL di acqua MilliQ sterile.

Ai campioni va addizionato il tampone MFF preparato al momento (20 µL per campioni inferiori o uguali a 10 µL e 25 µL per volumi superiori), poi vanno incubati per 5-10 minuti a 65°C e subito trasferiti in ghiaccio per 3-4 minuti. Aggiunti 5 µL di loading dye possono essere caricati sul gel, insieme ad uno standard a RNA (RNA Ladder high Range, 200-6000 basi, M-Medical, Cornaredo (MI), Italia).

Il gel deve correre in MOPS 1X a 120 V fino al completo svuotamento dei pozzetti e poi a 70 V per 3-5 ore o fino a quando la banda blu del loading dye non arriva a circa 1 cm dal fondo del gel. A fine corsa osservare al transilluminatore con luce UV di 365 nm come l'RNA si è separato e distribuito e scattare una fotografia del risultato.

Nel caso si abbiano molti campioni e siano necessari 2 gel, occorre cercare di mantenere identiche le condizioni di preparazione e lavoro per entrambi e può essere utile replicare un paio di campioni su entrambi i gel, così da poter normalizzare le eventuali differenze.

## **7.5 Preparazione delle sonde**

Le sonde utilizzate per l'ibridazione northern blot sono frammenti di geni codificanti alcune proteine che compongono la via metabolica degli stilbeni e dei flavonoidi e proteine di difesa PR-10. Sono state ottenute da DNA genomico di cellule di picciolo di Barbera (le stesse da cui è stato estratto l'RNA) non trattate, al quattordicesimo giorno di coltura. Si tratta quindi di

sonde omologhe, cioè che provengono dallo stesso organismo e che, quindi, sono esattamente identiche alla sequenza che si sta cercando.

L'amplificazione delle sonde è stata compiuta tramite PCR utilizzando 0,5 µg di DNA, con 2,5 U di DNA polimerasi PfuUltra HF (Stratagene, La Jolla, CA, USA) e 15 pmol di ciascun primer. Il programma PCR utilizzato prevede una prima fase di 1 min a 95°C, seguita da 40 cicli della sequenza 30 sec a 95°C, 30 sec a  $T_a$ , 3 min a 68°C ed un ultimo passaggio di allungamento di 10 min a 68°C. Le sequenze dei primers e le rispettive temperature di annealing (cioè di appaiamento dei filamenti complementari,  $T_a$ ) sono riportate nella seguente tabella:

<i>gene</i>	<i>primers</i>	$T_a$ (°C)
fenilalanina ammonio liasi (PAL)	5'-TATGCTCTCAGGACTTCACC-3' 5'-CCATTCTTCTCATTTTCGC-3'	51
stilbene sintasi (STS)	5'-AGTGGGGCCAACCAAAG-3' 5'-CATGCACTTGACATGTTACCG-3'	50
calcone sintasi (CHS)	5'-ACCGTCCTCCGCCTTGC-3' 5'-TGCCGAGTTGCTCTCAGTTTC-3'	57
calcone-flavanone isomerasi (CHI)	5'-GAAGTTCACAGCCATCGGAG-3' 5'-GGAGTTGCCTGGTGGGAAG-3'	53
pathogenesis-related protein 10 (PR-10)	5'-TGGGTGTTTTCACTTACGAG-3' 5'-ATCAGGATGTGCCAGGAC-3'	50

## 7.6 Northern blot

Col termine “blotting” si intende il trasferimento degli acidi nucleici dal gel ad una membrana di nylon Hybond<sup>TM</sup>-N (Amersham Biosciences, Milano, Italia). Si sfrutta la capillarità: gli acidi nucleici sono mossi dal flusso di tampone generato da un sistema assorbente. Il trasferimento deve avvenire in un ambiente acquoso salino in quanto l'aria interrompe il campo e quindi la migrazione.

Sul fondo di una bacinella stendere 5 spugne imbevute di SSC 10X e versare altro tampone fino al livello della terza spugna. Stendervi sopra 3 fogli di carta da banco (tagliati in modo da essere più grandi del gel ma più piccoli delle spugne) e 2 fogli di carta 3MM della stessa dimensione, poi premere bene affinché si imbevano di tampone e non rimangano bolle d'aria. Stendere il gel a faccia in giù ed eliminare nuovamente le bolle. Tagliare la membrana di nylon in modo che sia appena un po' più piccola del gel, imbibirla di SSC 10X, stenderla sul gel, tagliarle l'angolo sovrastante il marker, eliminare le bolle d'aria. Disporre larghe strisce

di parafilm sul bordo, in modo che coprano appena la membrana e il gel e che escano a isolare la carta sottostante. Sovrapporre 2 fogli di carta 3MM della dimensione della membrana ed imbevuti di SSC 10X, e poi 3 di carta da banco, avendo cura di non lasciare aria fra l'uno e l'altro. Coprire il tutto con uno strato uniforme alto almeno 5 cm di carta assorbente, facendo attenzione che non esca dal bordo isolante di parafilm. Porre in cima una lastra di vetro ed al centro un peso di circa 500 g. Lasciare immobile per almeno una notte, poi eventualmente sostituire la carta con altra asciutta, aggiungere SSC e lasciare alcune altre ore, fino a che tutto il colorante del loading dye non sia passato dal gel alla membrana. La carta, assorbendo il tampone dal basso verso l'alto, trascina gli acidi nucleici dal gel alla membrana.

Controllare al transilluminatore che il gel non contenga più RNA e che, invece, esso si sia trasferito sul nylon. Fotografare il risultato.

Per stabilizzare il legame degli acidi nucleici alla membrana occorre indurre un "crosslink": esporre per 150 secondi precisi la membrana coperta di carta 3MM imbevuta di SSC 10X a radiazioni ultraviolette di  $\lambda = 365$  nm. Segnare a matita il lato a cui è legato l'RNA e la posizione dei pozzetti. Far asciugare all'aria, tagliare la striscia di membrana contenente marker, spuntare il nuovo angolo nella parte coi campioni e poi conservare a  $-20^{\circ}\text{C}$  dentro a un foglio di carta da banco piegato.

## 7.7 Ibridazione

Tutto il lavoro descritto in questo paragrafo 7.7 va svolto in un laboratorio per radioisotopi adeguatamente attrezzato e tutelandosi con le dovute precauzioni.

Prima di eseguire l'ibridazione vera e propria, occorre preparare membrana (pre-ibridazione) e sonde (marcatura con  $^{32}\text{P}$ ). Pre-ibridazione ed ibridazione sono state eseguite secondo il protocollo descritto da Sambrook *et al.* (1989).

Inserire la membrana in un tubo da ibridazione con il lato legato all'RNA rivolto verso il centro (nel caso si abbiano 2 membrane metterle insieme senza sovrapporle, così da sottoporle ad identiche condizioni), versare 15-20 mL della soluzione di pre-ibridazione ed aggiungere un eccesso di DNA di sperma di salmone bollito per 10 minuti per distendere l'elica (fare attenzione a non versarlo direttamente sulla membrana). Tappare il tubo e incubare a  $42^{\circ}\text{C}$  in agitazione per almeno 2 ore.

Per marcare la sonda occorre prelevarne la giusta quantità (25-50 ng di DNA) e portare a 45  $\mu\text{L}$  con acqua MilliQ sterile, bollirla per 5 minuti e immediatamente porla in ghiaccio per altrettanto. Poi trasferirla nella eppendorf del kit di marcatura (Ready-To-Go DNA Labelling

Beads kit, Amersham Biosciences, Milano, Italia), controllare che la pallina effervescente del kit si sciolga completamente, spinnare ed aggiungere 5  $\mu\text{L}$  (600 Ci) di soluzione madre di  $^{32}\text{P}$  ( $\alpha[^{32}\text{P}]\text{dCTP}$ ; Amersham, attività specifica 3000 Ci/mmol). Incubare per 30 minuti in un bagno a  $37^\circ\text{C}$  e poi purificare dal fosforo non legato la sonda così marcata col kit QIAquick Gel Extraction Kit (50) (QIAGEN): aggiungere 200  $\mu\text{L}$  di buffer QG e 50  $\mu\text{L}$  di isopropanolo; trasferire tutto su una colonnina del kit; centrifugare 1 minuto a 9500g; sostituire il tubo, lavare la colonna con 500  $\mu\text{L}$  di buffer QG e centrifugare; sostituire il tubo, aggiungere 750  $\mu\text{L}$  di buffer PE; incubare 2 minuti a temperatura ambiente; centrifugare 2 volte per eliminare tutto il liquido; eluire la sonda dalla colonna con 50  $\mu\text{L}$  di acqua MilliQ sterile. Bollire altri 250  $\mu\text{L}$  di DNA di sperma di salmone 10 mg/ml e denaturarli assieme alle sonde marcate e purificate per 5 minuti in un termoblocco a  $100^\circ\text{C}$ , poi trasferire immediatamente la sonda in ghiaccio per 2 minuti affinché i filamenti di acido nucleico non riformino doppie eliche.

Terminata la pre-ibridazione della membrana, aggiungere nel tubo i 50  $\mu\text{L}$  di sonda marcata ed il DNA di salmone e incubare a  $42^\circ\text{C}$  in agitazione per almeno 12 ore. Questa è la vera e propria fase di ibridazione, in cui la sonda marcata si appaia specificatamente agli RNA messaggeri ad essa complementari presenti sulla membrana.

Al termine dell'ibridazione la membrana va lavata in condizioni di alta stringenza. Sostituire il tampone presente all'interno del tubo con circa 150-200 mL di SSPE 2X ed incubare in agitazione a  $42^\circ\text{C}$  per 10 minuti. Poi lavare 2 volte con SSPE 1X incubando in agitazione a  $42^\circ\text{C}$  per 10 minuti ed una volta con SSPE 0,5X incubando a  $60^\circ\text{C}$  per 10 minuti in agitazione.

Controllare col contatore geiger che la radioattività della membrana sia localizzata in una zona precisa e poi passare allo sviluppo ed alla lettura del risultato.

La stessa membrana può essere utilizzata per più ibridazioni successive, ma prima di ricominciare con la pre-ibridazione è necessario rimuovere la sonda precedente. Per questo scopo sono solitamente sufficienti 2 lavaggi di pochi minuti con SDS 0,1 % bollente.

## **7.8 Sviluppo e quantificazione**

Tutto il lavoro descritto in questo paragrafo 7.8 va svolto in un laboratorio per radioisotopi adeguatamente attrezzato e tutelandosi con le dovute precauzioni.

Per visualizzare l'avvenuta ibridazione della sonda, esporre la membrana marcata ad una lastra sensibile ( $^{32}\text{P}$  Imaging Plate, Fuji film, Japan) all'interno di una cassetta di sviluppo, per un tempo adeguato. Poi scansionare la lastra impressionata con l'apposito analizzatore

(Fluorescent Image Analyzer; FLA-3000, Fuji film, Japan). Con un appropriato programma di analisi di immagine (TotalLab versione 2.01; Nonlinear Dynamics Ltd., Newcastle upon Tyne, UK).

Con lo stesso analizzatore, impostato per la luce visibile, quantificare l'intensità del caricamento (banda dell'RNA ribosomale 18S) dalla fotografia (paragrafo 7.4) scattata al gel prima del trasferimento dell'RNA alla membrana.

Il segnale di espressione della sonda deve essere normalizzato per quello del caricamento.

## **8. IMMUNOLOCALIZZAZIONE DELLA STILBENE SINTASI**

Per localizzare l'enzima stilbene sintasi (STS) è stato utilizzato un metodo di immunolocalizzazione indiretto omogeneo e non competitivo. Indiretto in quanto sono necessari 2 anticorpi: il primario che lega direttamente il bersaglio (anti-STs) ed il secondario che lega il primario e che è marcato col fluorocromo, generando una amplificazione del segnale. Omogeneo perché tutti gli elementi si trovano nella stessa fase liquida. Non competitivo perché solo l'anticorpo primario può legarsi alla stilbene sintasi e non deve contendersi il bersaglio con altre molecole.

L'analisi è stata eseguita su protoplasti ottenuti da cellule al quarto giorno di coltura di picciolo di Barbera non trattate, elicitate con chitosano 50 µg/mL e addizionate di acido acetico, e cellule di bacca non trattate.

E' stato eseguito anche un controllo negativo in cui i protoplasti sono stati trattati col solo anticorpo secondario: venendo a mancare il suo bersaglio specifico (l'anticorpo primario) l'eventuale segnale fluorescente è dovuto a legami aspecifici di cui si deve tenere conto nell'analisi del risultato dei campioni trattati con entrambi gli anticorpi.

Tale analisi è stata eseguita presso il laboratorio del Prof. Sergio Sgorbati e della Dott.ssa Sandra Citterio, Dipartimento di Scienze dell'Ambiente e del Territorio, Università Milano Bicocca. Gli anticorpi primari anti-STs sono stati gentilmente messi a disposizione dalla Dott.ssa Francesca Sparvoli, Istituto di Biologia e Biotecnologie Agrarie, CNR, Milano. Questi anticorpi sono stati ottenuti in conigli immunizzati con stilbene sintasi di vite ricombinante prodotta in *E. coli* (Giorcelli *et al.*, 2004).

## 8.1 Isolamento dei protoplasti

I protoplasti sono stati preparati a partire da colture in liquido di cellule di picciolo e di bacca della cultivar Barbera. A tale scopo si è adattato il protocollo descritto da Lainè *et al.* (1988) e Lainè e David (1990) per il *Pinus*.

I protoplasti sono delicati ed hanno vita breve: occorre prepararli in un tampone isotonico, fissarli nel minor tempo possibile e maneggiarli con cura (ad esempio usare pipette Gilson con le punte tagliate per evitare di romperli).

La sospensione cellulare è stata filtrata su filtro di nylon e successivamente suddivisa in aliquote di 0,5 grammi in capsule Petri di diametro 5,0 cm. Ad ognuna sono stati aggiunti 3 mL di tampone avente pH 5,6 (aggiustato con KOH) e la seguente composizione:

glucosio	0,5 M	
CaCl <sub>2</sub>	6,0 mM	
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,7 mM	
MES	3,0 mM	
BSA	0,5 % (w/v)	
Cellulasi Y-C (Seishin Pharm. Co., Giappone)	2 % (w/v)	
Pectoliasi Y-23 (Seishin Pharm. Co., Giappone)	0,75 % (w/v)	
Macerozima R-10 (Honsha Co., Giappone)	0,075 % (w/v)	

Le capsule Petri chiuse sono state poste in agitazione a 45 rpm alla luce per 4 ore.

Al termine dell'incubazione si è filtrata la sospensione su un doppio strato di garza per separare i protoplasti dal materiale indigerito; la garza è stata lavata con 2 mL di tampone senza enzimi e poi delicatamente strizzata.

A questo punto, se il filtrato è sufficientemente pulito, si può passare direttamente alla conta ed all'utilizzo dei protoplasti, altrimenti segue una centrifugazione atta ad eliminare le impurezze (ma in questo modo andrà perduta oltre la metà dei protoplasti ottenuti). Il filtrato, quindi, è stato raccolto in una Falcon da 15 mL e centrifugato per 5 minuti a 20-25g. Il pellet è stato risospeso in 0,5 mL di tampone senza enzimi e si è proceduto alla conta dei protoplasti ottenuti con una camera Burkler.

## 8.2 Fissaggio dei protoplasti

Per fissare i protoplasti ottenuti, al termine delle 4 ore di incubazione con gli enzimi, è stata aggiunta formaldeide 4 % (v/v) e si è lasciata riposare la miscela in ghiaccio per 30 minuti. La sospensione è stata successivamente filtrata su un doppio strato di garza idrofila, suddivisa in



eppendorf e poi lavata 3 volte con tampone Tris vetrini per eliminare la formaldeide. Ogni lavaggio consiste in una centrifugazione di 3 minuti a 35g, seguita da 30 minuti di deposito in ghiaccio, dall'eliminazione del surnatante e dall'aggiunta di nuovo tampone.

Il tampone Tris vetrini è costituito da Tris base 1,2 g/L , NaCl 5,84 g/L , EDTA 3,72 g/L , pH 7,3.

Il volume nelle eppendorf è stato progressivamente ridotto per concentrare i protoplasti ed entro la fine dei lavaggi si sono ottenute 2 eppendorf per ogni campione: una per l'immunolocalizzazione vera e propria ed una per il controllo negativo.

Dopo il secondo lavaggio e senza eliminare il surnatante, le sospensioni possono essere conservate in frigorifero e al buio per una notte.

Prima di cominciare i lavaggi, una piccola aliquota dei campioni è stata marcata col Calcofluor (fluorescent brighter 28, Sigma) ed osservata al microscopio a fluorescenza per verificare l'effettiva digestione della parete cellulare. Il Calcofluor, infatti, è un colorante fluorescente che marca la cellulosa.

### **8.3 Marcatura**

I protoplasti di Barbera ottenuti e fissati secondo i suddetti protocolli sono stati utilizzati per una analisi di immunolocalizzazione dell'enzima stilbene sintasi.

Alla fine dei lavaggi dei protoplasti fissati in formaldeide, si è eliminata circa la metà del surnatante e si è aggiunto un pari volume di una soluzione composta da tampone Tris vetrini + Triton 0,05 % (v/v) + latte in polvere 1 % (w/v). E' seguita un'ora di agitazione su un agitatore a ruota a temperatura ambiente, poi una centrifugazione di 3 minuti a 35g e un deposito di 30 minuti in ghiaccio.

Una volta eliminato il surnatante, ad una eppendorf per campione sono stati aggiunti 0,5 mL di tampone Tris vetrini + Triton 0,05 % + latte in polvere 0,1 % + anticorpo anti-STS diluito 1:100; nell'altra eppendorf (il controllo negativo) 0,5 mL della stessa soluzione ma senza l'anticorpo primario.

Sono nuovamente seguite 1 ora di incubazione sull'agitatore a ruota a temperatura ambiente, una centrifugazione di 3 minuti a 35g e mezz'ora di deposito in ghiaccio. Successivamente si è eliminato il surnatante, si sono aggiunti 0,8 mL di tampone Tris vetrini + Triton 0,05 % e si è lasciato depositare per 5 minuti in ghiaccio. E' seguita una centrifugata e un ulteriore deposito di 15 minuti in ghiaccio.

A tutti i campioni, compresi i controlli negativi, è stato tolto il surnatante e sono stati aggiunti 0,5 mL di tampone Tris vetrini + Triton 0,05 % + latte in polvere 0,1 % + anticorpo secondario alexafluor diluito 1:200. Essendo questo anticorpo fluorescente, è fondamentale da questo punto in poi mantenere sempre al buio i campioni.

Sono seguite una agitazione in ruota di 30 minuti, una centrifugazione e una deposizione in ghiaccio di 20 minuti. Si è poi sostituito il surnatante con 0,8 mL di tampone Tris vetrini + Triton 0,05 % per lavare via l'anticorpo non legato. Dopo un'ultima centrifugata e 30 minuti in ghiaccio, il surnatante è stato nuovamente sostituito da 0,5 mL di tampone Tris vetrini ed i campioni sono stati pronti per l'osservazione al microscopio a fluorescenza. Sono stati quindi osservati al microscopio ad una lunghezza d'onda di eccitazione di 488 nm e confrontati coi rispettivi controlli negativi.

I campioni possono essere conservati per diverso tempo al buio ed in frigorifero.

#### **8.4 Osservazioni al microscopio confocale**

La microscopia confocale permette di ottenere immagini ad alta risoluzione di campioni biologici, come se fossero sezionati orizzontalmente in molti piani diversi. Il numero e lo spessore delle sezioni è impostato volta per volta dall'operatore: in queste analisi sono state osservate sezioni di altezza inferiore a 1  $\mu\text{m}$ . Inoltre è un microscopio a fluorescenza, quindi i campioni possono essere marcati con fluorocromi che emettono a diverse lunghezze d'onda. E' particolarmente utile per tecniche di immunolocalizzazione, cioè per identificare in modo preciso dove sia disposta la marcatura all'interno del protoplasto o della cellula.

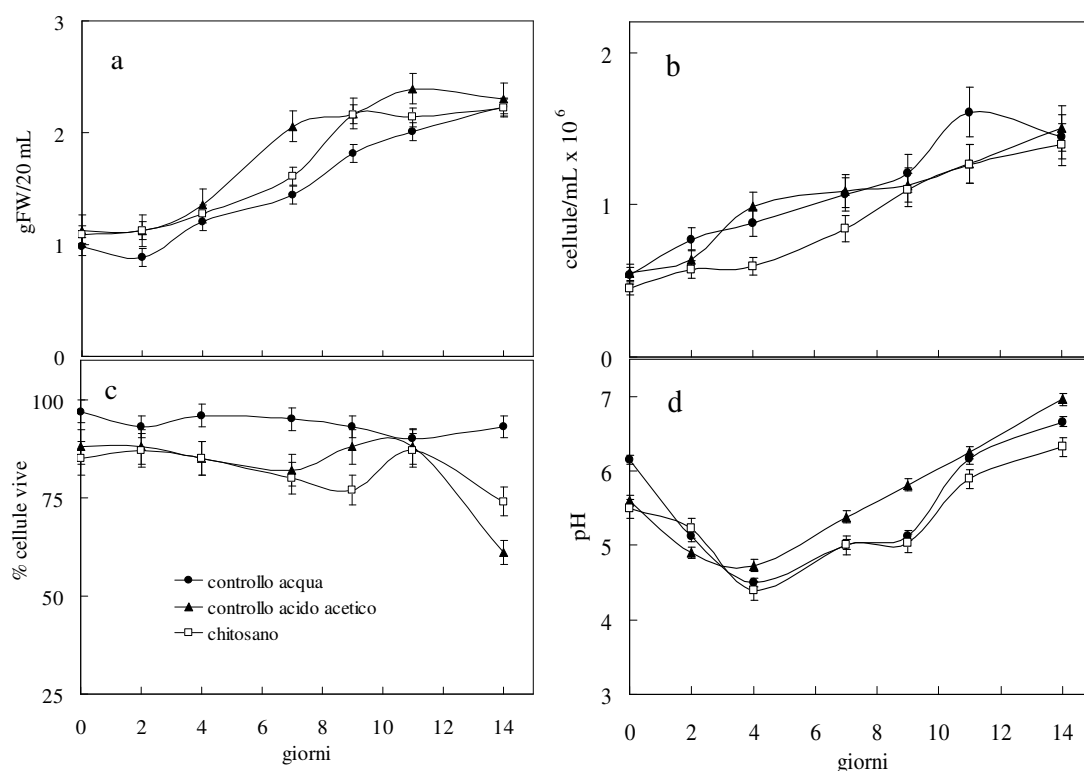
L'analisi è stata eseguita sui quattro campioni di protoplasti marcati. Al momento dell'osservazione i campioni sono stati colorati con un pari volume di soluzione di 0,1 mg/mL di propidio ioduro per marcare i nuclei e gli eventuali residui di parete.

Il microscopio confocale impiegato è un Leica Confocal System TCS SL (Wetzlar, Germany) ed i filtri sono quelli standard per la fluorescenza verde tipo FITC (eccitazione 470-490 nm, emissione 520-530 nm) e rossa tipo TRITC (eccitazione 550-570 nm, emissione 580-595 nm).

# RISULTATI

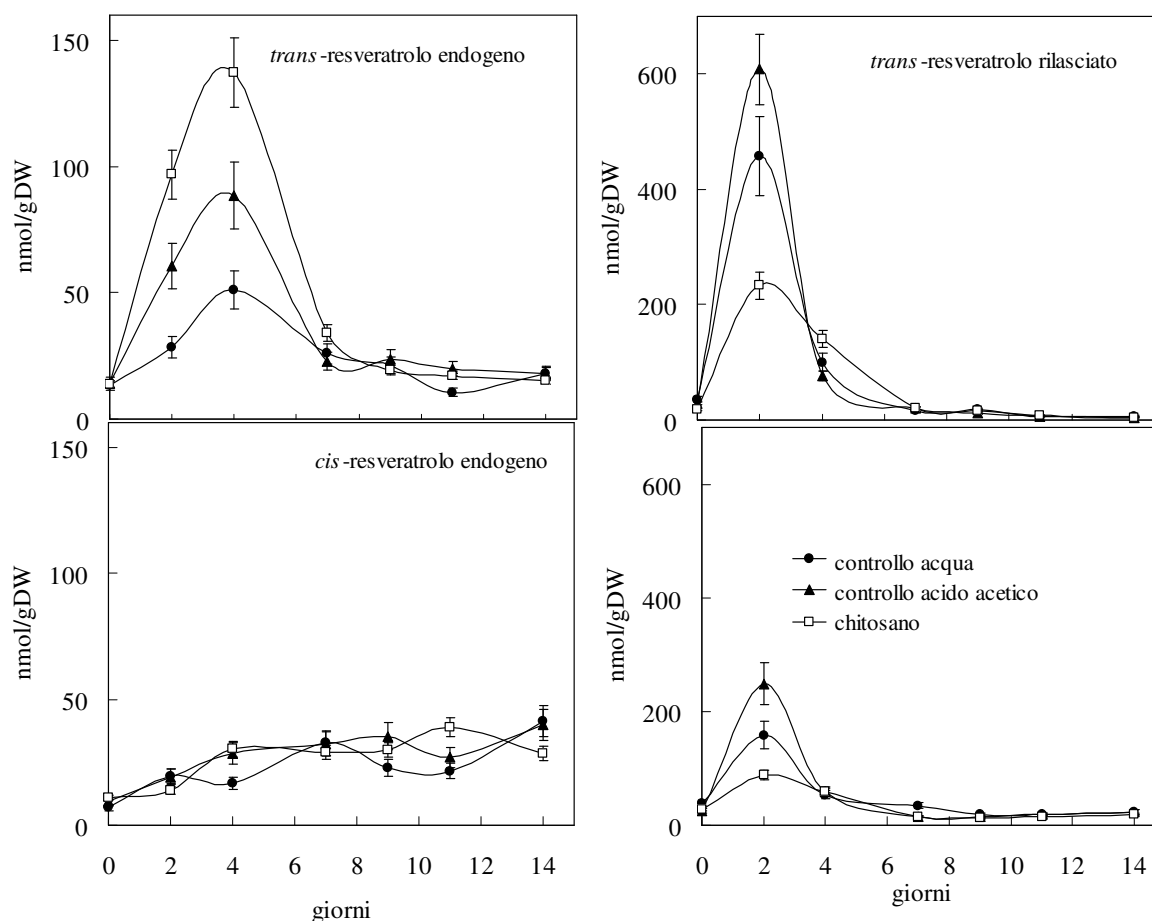
## 1. TRATTAMENTO CON CHITOSANO

Le colture cellulari della cv. Barbera (*Vitis vinifera*) sono state addizionate al giorno 0 con 50  $\mu\text{g/mL}$  di chitosano in acido acetico con concentrazione finale 0,01 % (v/v) o acido acetico 0,01 % (v/v) (controllo acido acetico) e sono state confrontate con una coltura non trattata (controllo acqua). Tutte le colture hanno mostrato una fase esponenziale di crescita, in termini di peso fresco, fra i giorni 2 e 11, seguita da una fase stazionaria (Figura 13a). Questo andamento è stato confermato dal conteggio del numero delle cellule (Figura 13b). Il tempo medio di duplicazione, calcolato a partire dal peso fresco, è di 11,9 giorni per il controllo non trattato e di 13,6 giorni per le colture trattate con acido acetico e chitosano. La vitalità delle cellule è stata leggermente ridotta in presenza di acido acetico o chitosano (Figura 13c). Il pH dei terreni di coltura è diminuito da pH 6,2 (giorno 0) a 4,5 (giorno 4) e poi è risalito linearmente a 6.7 (giorno 14), indipendentemente dal trattamento (Figura 13d).



**Figura 13.** Parametri di crescita delle colture di cellule di Barbera (*Vitis vinifera*) trattate con chitosano 50  $\mu\text{g/mL}$  e delle relative colture controllo in acido acetico 0,01 % (v/v) e non trattate. I dati sono la media di 3 campioni (repliche biologiche)  $\pm$  SD (deviazione standard). Gli esperimenti sono stati ripetuti due volte con risultati simili. (a) peso fresco espresso in g/20 mL; (b) conta cellulare espressa in numero di cellule/mL; (c) vitalità espressa come percentuale di cellule vive; (d) pH del terreno.

Confrontato ad entrambi i controlli, il trattamento con chitosano ha promosso l'accumulo endogeno di *trans*-resveratrolo con un picco al giorno 4, mentre non ha influenzato la produzione dell' isomero *cis*. Allo stesso tempo il chitosano ha fatto diminuire il rilascio sia di *trans* che di *cis*-resveratrolo rispetto ai controlli, almeno al giorno 2 (Figura 14).



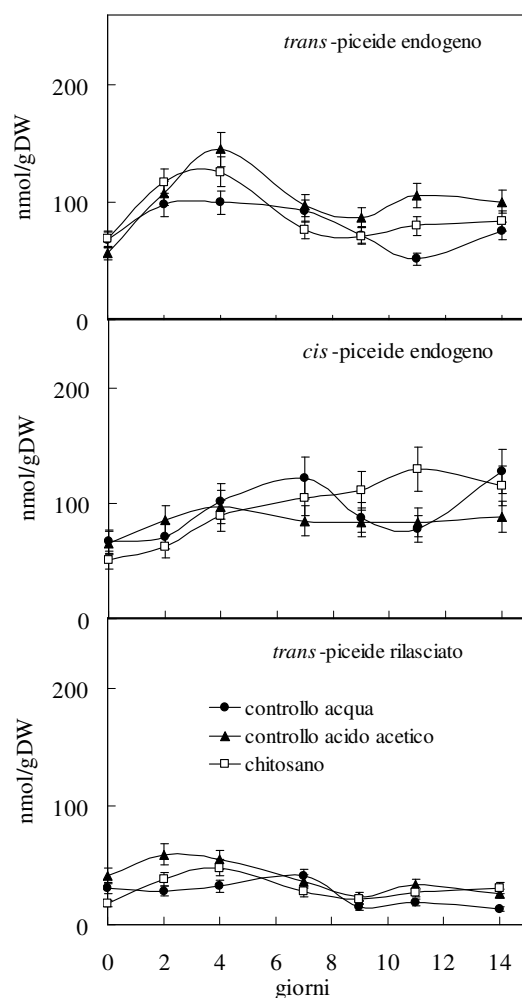
**Figura 14.** *Trans* e *cis*-resveratrolo determinato tramite analisi HPLC-DAD all'interno delle cellule e nel terreno delle colture di cellule di Barbera (*Vitis vinifera*) trattate con chitosano 50 µg/mL e delle relative colture controllo in acido acetico 0,01 % (v/v) e non trattate. I dati sono la media di 3 campioni ± SD. Gli esperimenti sono stati ripetuti due volte con risultati simili.

I livelli dettagliati dei monoglucosidi endogeni e rilasciati (resveratrolside e piceide, isomeri *cis* e *trans*), hanno dimostrato che i singoli composti non sono stati significativamente influenzati dal trattamento con chitosano (Figure 15 e 16).

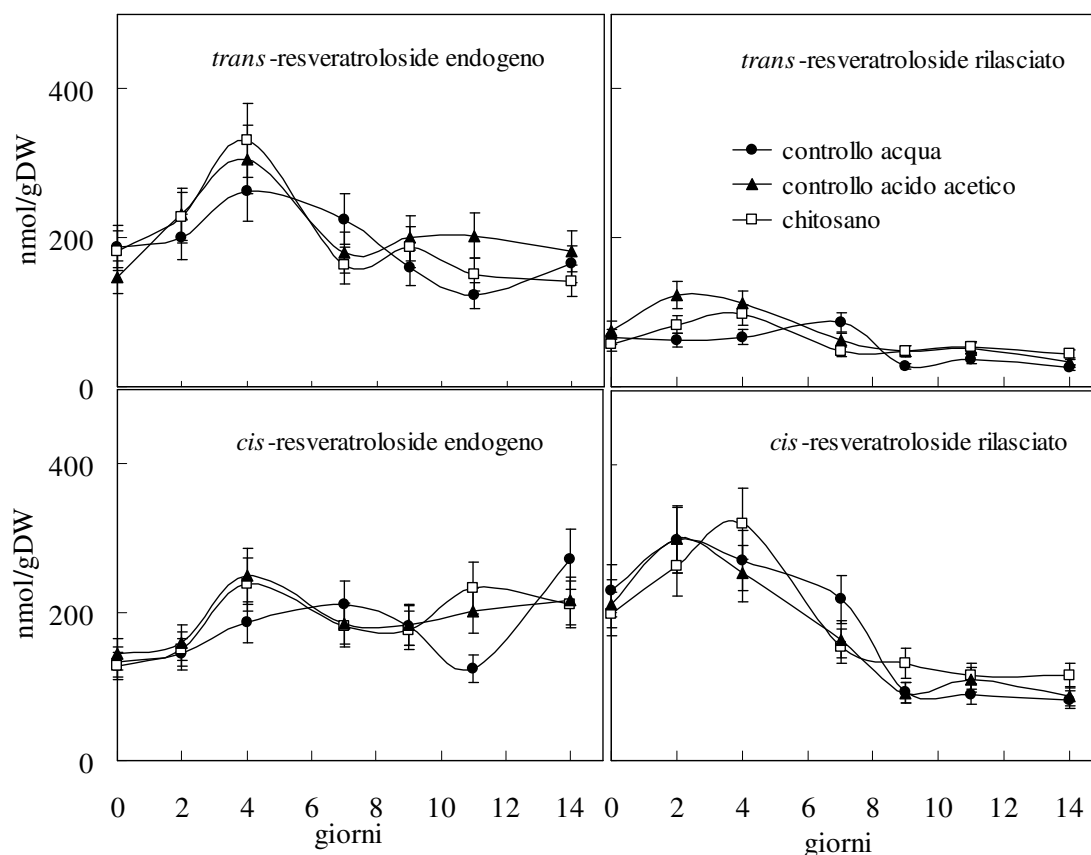
Prima del trattamento, nelle sospensioni delle cellule di Barbera sono stati misurati i livelli totali (isomeri *trans* più *cis*) endogeni di resveratrolo e di due suoi monoglucosidi, il resveratrolside (3,5,4'-diidrossistilbene-4'-O-β-D-glucopiranoside) ed il piceide (3,5,4'-diidrossistilbene-3-O-β-D-glucopiranoside). Al giorno 0, le quantità totali di resveratrolside

(320 nmol/gDW) e di piceide (135 nmol/gDW), erano rispettivamente 160 e 6,5 volte superiori al resveratrolo totale (20 nmol/gDW).

Non è stato analizzato il contenuto di piceatannolo.



**Figura 15.** *Trans* e *cis*-piceide determinato tramite analisi HPLC-DAD all'interno delle cellule e nel terreno delle colture di cellule di Barbera (*Vitis vinifera*) trattate con chitosano 50 µg/mL (chitosan) e delle relative colture controllo in acido acetico 0,01 % (v/v) (acetic acid control) e non trattate (water control). Il *cis*-piceide rilasciato nel terreno era presente in tracce. I dati sono la media di 3 campioni ± SD. Gli esperimenti sono stati ripetuti due volte con risultati simili.

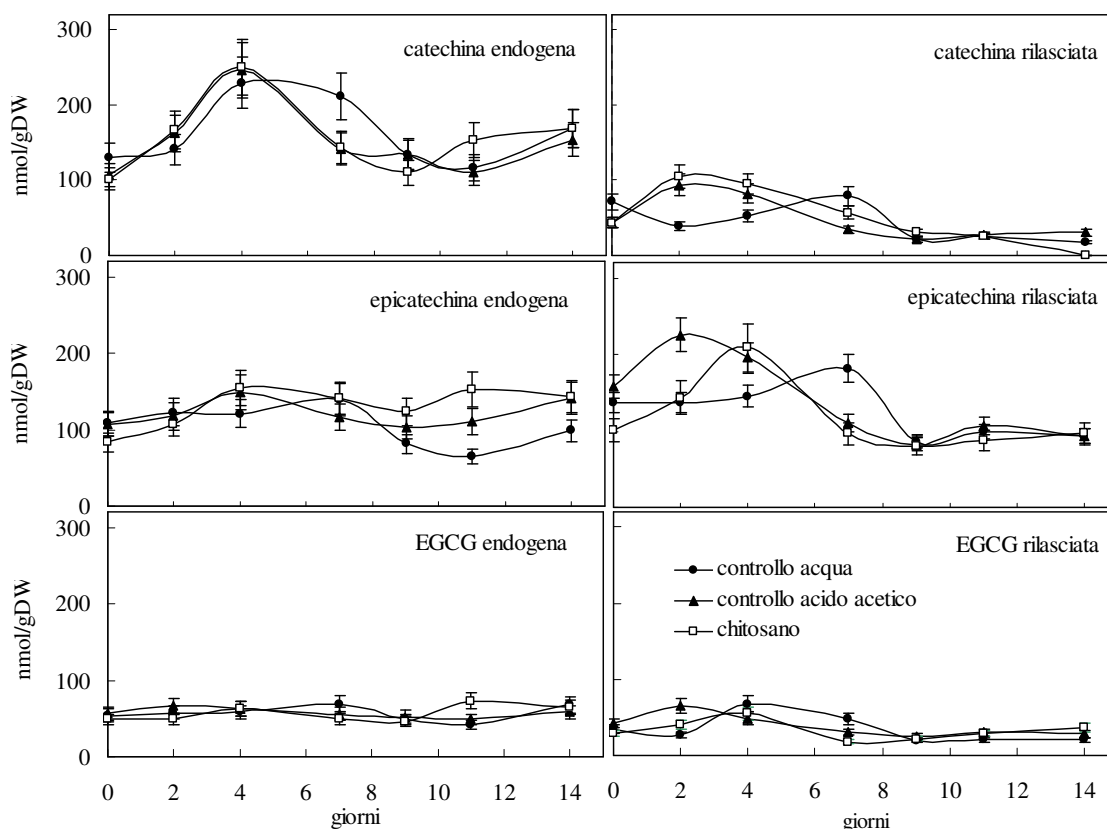


**Figura 16.** *Trans* e *cis*-resveratroloside determinati tramite analisi HPLC-DAD all'interno delle cellule e nel terreno delle colture di cellule di Barbera (*Vitis vinifera*) trattate con chitosano 50 µg/mL (chitosan) e delle relative colture controllo in acido acetico 0,01 % (v/v) (acetic acid control) e non trattate (water control). I dati sono la media di 3 campioni  $\pm$  SD. Gli esperimenti sono stati ripetuti due volte con risultati simili.

I livelli di alcuni flavonoidi ed acidi idrossicinnamici sono stati determinati durante il periodo di osservazione. Naringenina, quercetina, rutina, epigallocatechina, epicatechina gallata e gli acidi gallico, *trans*-cinnamico, *p*-coumarico, caffeico, clorogenico, ferulico e sinapico erano assenti o presenti in tracce.

La catechina, l'epicatechina e l'epigallocatechina-gallata (EGCG) sono state rilevate sia all'interno delle cellule che nei terreni di coltura. Il trattamento con chitosano non ha stimolato la sintesi e/o l'accumulo endogeno di catechina, epicatechina ed EGCG, mentre una quantità leggermente superiore di catechina ed l'epicatechina è stata rilasciata nel terreno dal giorno 2 al 4 nei trattamenti con chitosano ed acido acetico (Figura 17). Il trattamento con chitosano non ha influenzato il rilascio di EGCG.

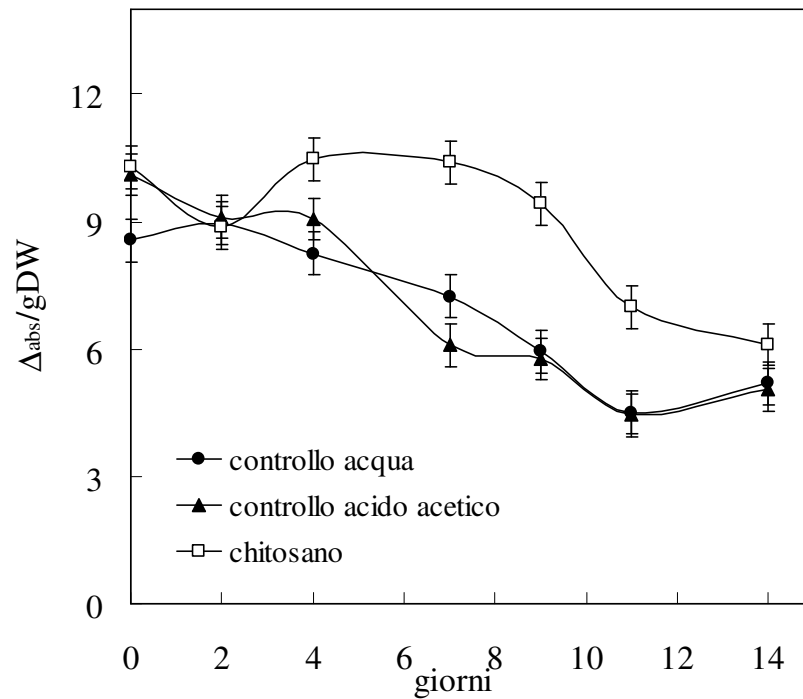
Non è stato analizzato il contenuto di kaemferolo.



**Figura 17.** Accumulo endogeno e rilascio di 3 composti appartenenti alla famiglia delle catechine, catechina, epicatechina ed epigallo catechina gallata (EGCG), determinato tramite analisi HPLC-DAD nelle colture di cellule di Barbera (*Vitis vinifera*) trattate con chitosano 50 µg/mL (chitosan) e delle relative colture controllo in acido acetico 0,01 % (v/v) (acetic acid control) e non trattate (water control). I dati sono la media di 3 campioni  $\pm$  SD. Gli esperimenti sono stati ripetuti due volte con risultati simili.

In cellule trattate con chitosano, il livello di antociani totale è risultato essere circa 2 volte superiore dal giorno 4 a 14 rispetto ai due controlli (Figura 18). Ciò conferma le osservazioni macroscopiche secondo cui le sospensioni trattate hanno mostrato un colore marrone-rosso intenso dal giorno 3 in avanti. Al contrario, in entrambe le colture di controllo è stata misurata una diminuzione progressiva della quantità totale di antociani durante tutto il periodo di osservazione (Figura 18).

Su campioni di cellule al quarto giorno di coltura (corrispondente al picco di massima produzione del resveratrolo) è stata eseguita l'analisi colorimetrica con 3,3'-diamminobenzidina (DAB) per determinare l'accumulo di  $H_2O_2$ . Attraverso le osservazioni al microscopio ottico, non sono state notate differenze di colore fra i trattamenti, quindi l'aggiunta di chitosano non sembra aver avuto come conseguenza una sovra-produzione di  $H_2O_2$ . Oppure sintesi e degradazione del perossido di idrogeno potrebbero essere avvenute durante le prime ore di contatto con l'elicatore e quindi non essere visibili dopo 4 giorni.

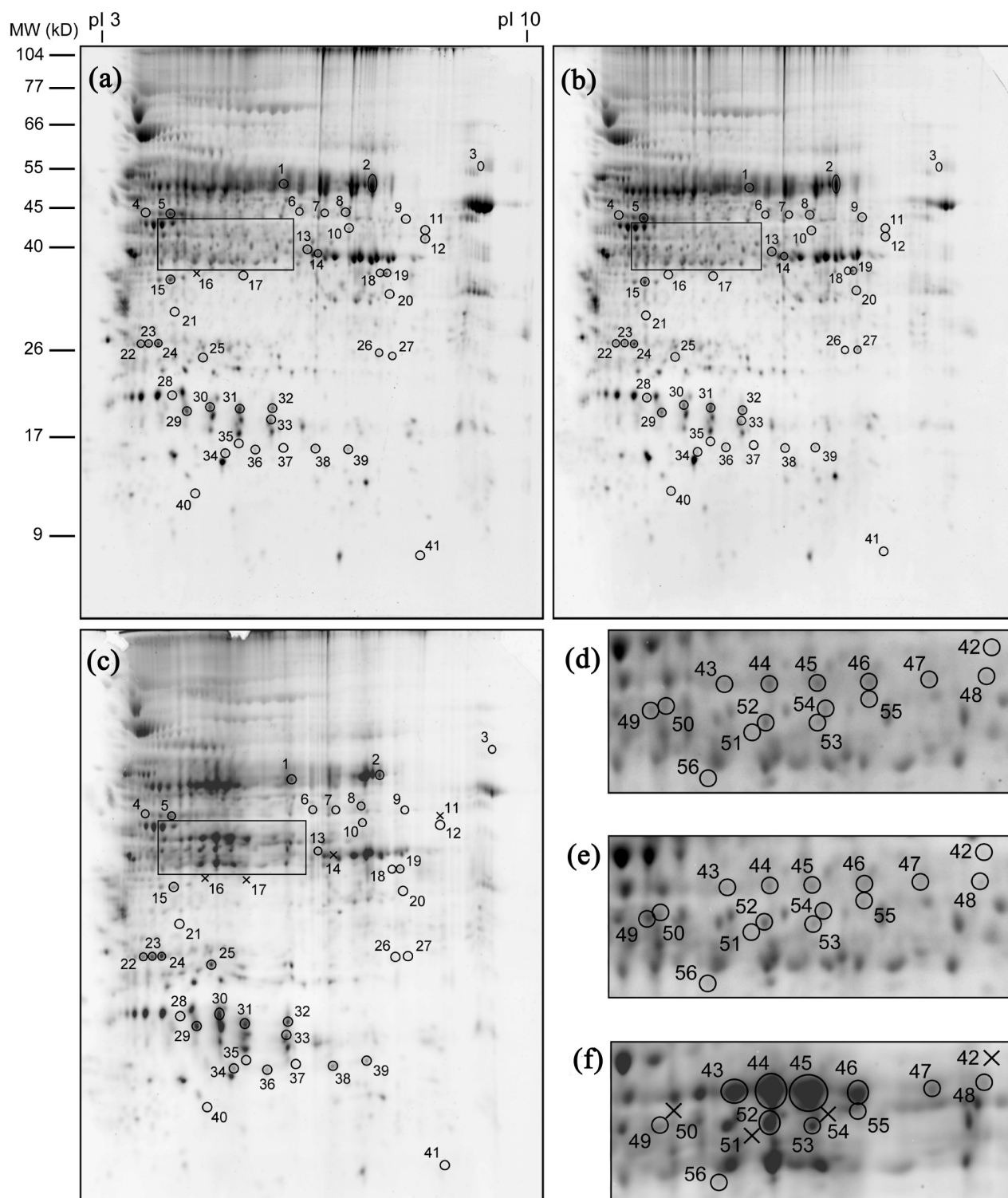


**Figura 18.** Antociani totali quantificati tramite analisi spettrofotometrica nelle colture di cellule di Barbera (*Vitis vinifera*) trattate con chitosano 50  $\mu g/mL$  (chitosan) e nelle relative colture controllo in acido acetico 0,01 % (v/v) (acetic acid control) e non trattate (water control). I dati sono espressi come la variazione di unità di assorbanza per grammo di peso secco ( $\Delta_{Abs}/gDW$ ) ed è stata eseguita una correzione per l'eventuale presenza di composti di degradazione della clorofilla. I dati sono la media di 3 campioni  $\pm$  SD. Gli esperimenti sono stati ripetuti due volte con risultati simili.



## 2. ANALISI PROTEOMICHE SU ESTRATTI PROTEICI TOTALI

Le sospensioni di cellule della cv. Barbera (*Vitis vinifera*) trattate con chitosano 50 µg/mL ed i due controlli con acqua e con acido acetico 0,01% (v/v) sono state campionate al quarto giorno di coltura, corrispondente alla massima produzione del *trans*-resveratrolo (Figura 14). I 3 estratti proteici totali sono stati separati tramite elettroforesi bidimensionale con la prima dimensione pI 3-10 non lineare (Figura 19). Per ogni trattamento sono stati eseguiti due replicati biologici con due repliche tecniche (quattro gel in totale) ottenendo risultati simili. L'intensità di 73 spots è risultata essere cambiata in modo significativo (almeno 2 volte più alta o più bassa) nei campioni trattati confrontati coi controlli, o fra i due controlli (Figura 19). Questi spots sono stati prelevati dai gel ed analizzati tramite spettrometria di massa matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight (MALDI-ToF) e MALDI tandem (MALDI-MSMS). I fingerprints di ogni campione proteico sono stati confrontati con la banca dati non ridondante del National Centre for Biotechnology Information (NCBI), usando l'algoritmo di ricerca MASCOT Peptide Mass Fingerprint. Gli spots non identificati sono stati analizzati ulteriormente tramite spettrometria tandem con un quadrupolo time of flight (Q-ToF) e usando l'algoritmo MASCOT MSMS Ion Search nella stessa banca dati non ridondante dell'NCBI. Le poche proteine non ancora identificate sono state sequenziate *de novo* (DNVS). In totale 56 proteine sono state identificate su 73 che variavano in modo significativo. Le proteine identificate possono essere suddivise secondo il profilo metabolico a cui appartengono (Tabella 1).



**Figura 19.** Analisi proteomiche delle colture di cellule di Barbera (*Vitis vinifera*) trattate con chitosano 50  $\mu\text{g/mL}$  e delle relative colture controllo in acido acetico 0,01 % (v/v) e non trattate. Gli estratti proteici totali da cellule al giorno 4 sono stati separati su gel 2D (prima dimensione pI 3-10 non lineare, seconda dimensione 10% Duracryl gels). (a) Controllo non trattato. (b) Controllo con acido acetico 0,01 % (v/v). (c) Cellule trattate con chitosano 50  $\mu\text{g/mL}$ . (d, e, f) Ingrandimenti dei riquadri in a, b e c rispettivamente dall'alto. I numeri si riferiscono alle proteine identificate elencate nella Tabella 1; le proteine non identificate non sono mostrate. Due repliche biologiche con due replicati tecnici sono stati eseguiti per ogni campione ottenendo risultati simili.

**Tabella 1.** Proteine identificate con spettrometria di massa dopo separazione elettroforetica 2D di estratti proteici totali da cellule di *Vitis vinifera* (cv. Barbera) campionate al quarto giorno di coltura di controllo acqua, controllo acido acetico 0,01 % (v/v) e trattamento con chitosano 50 µg/mL.

Numero spot	Proteina	Mowse score <sup>a</sup>	Tecnica	Organismo	SwissProt accession number	FC <sup>b</sup> ac.ac./acqua	FC <sup>b</sup> chit./acqua	FC <sup>b</sup> chit./ac.ac.
<b>Vie biosintetiche di stilbeni e composti correlati</b>								
<b>19</b>	Class III peroxidase (EC 1.11.1.7)	120	Q-ToF <sup>c</sup>	<i>Gossypium hirsutum</i>	Q8RVP7	-	-3.7 ± 0.1	-2.9 ± 0.1
<b>22</b>	Chalcone-flavonone isomerase (EC 5.5.1.6)	115	MALDI-ToF <sup>c</sup>	<i>Vitis vinifera</i>	P51117	-	-	2.4 ± 0.1
<b>23</b>	Chalcone-flavonone isomerase (EC 5.5.1.6)	256	Q-ToF	<i>Vitis vinifera</i>	P51117	-2.6 ± 0.1	-	3.3 ± 0.1
<b>43</b>	Stilbene synthase 1 (EC 2.3.1.95)	57	Q-ToF	<i>Vitis vinifera</i>	P28343	-	3.7 ± 0.1	3.8 ± 0.1
<b>44</b>	Stilbene synthase 1 (EC 2.3.1.95)	210	Q-ToF <sup>c</sup>	<i>Vitis vinifera</i>	P28343	-	4.9 ± 0.1	4.6 ± 0.1
<b>45</b>	Stilbene synthase 1 (EC 2.3.1.95)	128	Q-ToF <sup>c</sup>	<i>Vitis vinifera</i>	P28343	-	6.0 ± 0.1	10.1 ± 0.1
<b>46</b>	Stilbene synthase 1 (EC 2.3.1.95)	180	Q-ToF <sup>c</sup>	<i>Vitis vinifera</i>	P28343	-	5.5 ± 0.2	8.3 ± 0.2
<b>47</b>	Stilbene synthase 1 (EC 2.3.1.95)	134	Q-ToF	<i>Vitis vinifera</i>	P28343	-	4.0 ± 0.1	3.2 ± 0.1
<b>48</b>	Stilbene synthase 1 (EC 2.3.1.95)	74	Q-ToF	<i>Vitis vinifera</i>	P28343	-	6.2 ± 0.1	4.6 ± 0.1
<b>Altri meccanismi di difesa</b>								
<b>2</b>	Catalase (EC 1.11.1.6)	127	MALDI-ToF	<i>Vitis vinifera</i>	Q8S568	-	-3.6 ± 0.3	-2.3 ± 0.2
<b>24</b>	Glutathione S-transferase (EC 2.5.1.18)	53	Q-ToF	<i>Arabidopsis thaliana</i>	P51117	-3.2 ± 0.1	-	2.8 ± 0.1

29	Pathogenesis-related protein 10 (PR10.2)	104	MALDI-ToF <sup>c</sup>	<i>Vitis vinifera</i>	Q9FS43	-	-	2.4 ± 0.1
30	Pathogenesis-related protein 10 (PR10.2)	74	MALDI-MSMS <sup>c</sup>	<i>Vitis vinifera</i>	Q9FS43	-	-	2.3 ± 0.3
31	Pathogenesis-related protein 10 (PR10.2)	85	MALDI-MSMS <sup>c</sup>	<i>Vitis vinifera</i>	Q9FS43	-	2.6 ± 0.2	2.4 ± 0.1
32	Pathogenesis-related protein 10 (PR10.2)	108	MALDI-MSMS <sup>c</sup>	<i>Vitis vinifera</i>	Q9FS43	-	-	2.3 ± 0.2
33	Pathogenesis-related protein 10 (PR10.2)	90	MALDI-ToF <sup>c</sup>	<i>Vitis vinifera</i>	Q9FS43	-	-	2.3 ± 0.1
34	Pathogenesis-related protein 10 (PR10.1)	332	Q-ToF <sup>c</sup>	<i>Vitis vinifera</i>	Q9FS42	-2.6 ± 0.2	-	3.2 ± 0.1
35	Pathogenesis-related protein 10 (PR10.2)	85	MALDI-ToF <sup>c</sup>	<i>Vitis vinifera</i>	Q9FS43	-2.5 ± 0.1	-	4.4 ± 0.1
36	Pathogenesis-related protein 10 (PR10.1)	76	MALDI-ToF	<i>Vitis vinifera</i>	Q9FS42	-	2.8 ± 0.1	3.2 ± 0.1
37	Pathogenesis-related protein 10	89	MALDI-ToF <sup>c</sup>	<i>Vitis pseudoreticulata</i>	Q21305	-2.5 ± 0.1	-	4.5 ± 0.1
38	Pathogenesis-related protein 10 (PR10.1)	191	Q-ToF	<i>Vitis vinifera</i>	Q9FS42	-	2.3 ± 0.1	3.3 ± 0.1
39	Pathogenesis-related protein 10 (PR10.1)	231	Q-ToF	<i>Vitis vinifera</i>	Q9FS42	-	-	2.2 ± 0.1
40	Lycopene β-cyclase (Fragment)	68	MALDI-ToF	<i>Citrus sinensis</i>	Q766E9	-	2.3 ± 0.1	2.2 ± 0.1

---

**Trascrizione del DNA, processamento di mRNA e proteine**

1	Mitochondrial processing peptidase β subunit (EC 3.4.24.64)	157	Q-ToF <sup>c</sup>	<i>Cucumis melo</i>	Q9AXQ2	-	-2.4 ± 0.1	-3.3 ± 0.1
---	---	-----	--------------------	---------------------	--------	---	------------	------------

4	Eukaryotic initiation factor 4A	144	MALDI-ToF <sup>c</sup>	<i>Oryza sativa</i>	Q54AC9	-	-5.9 ± 0.1	-6.6 ± 0.1
5	Eukaryotic initiation factor 4A	349	Q-ToF <sup>c</sup>	<i>Oryza sativa</i>	Q54AC9	2.8 ± 0.1	-	-1.9 ± 0.1
7	Elongation factor 1-γ	68	DNVS <sup>c</sup>	<i>Oryza sativa</i>	Q9ZRI7	-	-2.2 ± 0.1	-2.4 ± 0.1
15	60S acidic ribosomal protein P0-C	299	Q-ToF	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Q8LAM3	2.8 ± 0.1	-	-2.2 ± 0.1
18	TGF-beta receptor-interacting protein 1	151	Q-ToF	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Q94KS2	-2.9 ± 0.1	-3.6 ± 0.1	-
21	MADS-box protein.	65	Q-ToF	<i>Malus domestica</i>	O82699	-	-2.6 ± 0.1	-2.6 ± 0.1
26	Putative 20S proteasome β subunit 5 (Fragment)	139	Q-ToF	<i>Prunus persica</i>	Q93WZ4	-2.1 ± 0.1	-2.4 ± 0.1	-
27	20S proteasome β subunit (EC 3.4.99.46)	79	DNVS	<i>Arabidopsis thaliana</i>	O23718	-	-	-2.1 ± 0.1
28	Tumor-related protein - endopeptidase inhibitor activity	81	Q-ToF	<i>Nicotiana tabacum</i>	P93378	-	2.2 ± 0.1	2.2 ± 0.1
41	Polyubiquitin (Fragment)	84	Q-ToF	<i>Vitis vinifera</i>	Q66N71	-2.3 ± 0.1	-	-
42	Putative RNA-binding protein	66	DNVS <sup>c</sup>	<i>Oryza sativa</i>	Q7XDI5	-2.1 ± 0.1	ND in chitosano	ND in chitosano
51	Putative U4/U6-associated RNA splicing factor	82	Q-ToF	<i>Oryza sativa</i>	Q6K476	-	ND in chitosano	ND in chitosano
<b>Metabolismo energetico</b>								
8	2-oxoglutarate dehydrogenase E2 subunit (EC 2.3.1.61)	143	Q-ToF <sup>c</sup>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Q9FLQ4	-	-	-2.1 ± 0.1
13	Cytosolic glyceroldehyde-3-phosphate dehydrogenase GAPC4 (EC 1.2.1.12)	349	Q-ToF	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Q43359	2.4 ± 0.1	-	-2.0 ± 0.1

14	Cytosolic glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (EC 1.2.1.12) (Fragment)	124	MSMS <sup>c</sup>	<i>Zea mays</i>	P08735	-	ND in chitosano	ND in chitosano
16	Malate dehydrogenase precursor (EC 1.1.1.37)	218	Q-ToF	<i>Medicago sativa</i>	O48906	ND in acqua	ND in acqua e chitosano	ND in chitosano
17	Malate dehydrogenase precursor (EC 1.1.1.37)	159	Q-ToF	<i>Medicago sativa</i>	O48906	-	ND in chitosano	ND in chitosano
20	Ferredoxin NADP oxidoreductase, putative (EC 1.18.1.2)	118	Q-ToF	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Q8LA56	-	-2.5 ± 0.1	-2.5 ± 0.1
25	Putative quinone oxidoreductase (EC 1.6.5.5)	131	Q-ToF	<i>Cicer arietinum</i>	Q8L5Q7	3.0 ± 0.1	9.7 ± 0.2	3.2 ± 0.2
52	Phosphoglycerate kinase (EC 2.7.2.3)	157	Q-ToF <sup>c</sup>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Q9LD57	-	2.1 ± 0.1	2.0 ± 0.1
53	Cytosolic phosphoglycerate kinase 1 (EC 2.7.2.3)	163	Q-ToF <sup>c</sup>	<i>Populus nigra</i>	O82159	-	-	2.6 ± 0.1
54	Phosphoglycerate kinase, cytosolic (EC 2.7.2.3)	105	Q-ToF <sup>c</sup>	<i>Triticum aestivum</i>	Q850M3	-2.6 ± 0.1	ND in chitosano	ND in chitosano
55	Phosphoglycerate kinase (EC 2.7.2.3)	106	Q-ToF	<i>Nicotiana tabacum</i>	Q42961	-	4.0 ± 0.1	5.4 ± 0.1
<b>Metabolismo degli amminoacidi</b>								
10	Aspartate aminotransferase (EC 2.6.1.1)	67	Q-ToF	<i>Lotus corniculatus</i>	O22618	-	-2.1 ± 0.1	-2.4 ± 0.1
49	Glutamine synthetase (EC 6.3.1.2)	84	Q-ToF	<i>Vitis vinifera</i>	Q93XJ6	4.2 ± 0.1	4.4 ± 0.1	-
50	Glutamine synthetase (EC 6.3.1.2)	47	Q-ToF <sup>c</sup>	<i>Vitis vinifera</i>	Q93XJ6	ND in ac.acetico	ND in chitosano	ND in ac.acetico e chitosano

<b>Altre proteine</b>								
<b>3</b>	Pectinesterase (EC 3.1.1.11) (Fragment)	127	Q-ToF	<i>Lycopersicon esculentum</i>	O04870	-2.2 ± 0.1	-5.7 ± 0.1	-2.7 ± 0.1
<b>6</b>	Sulfate adenylyltransferase (EC 2.7.7.4)	166	Q-ToF <sup>c</sup>	<i>Solanum tuberosum</i>	Q43183	-	-6.9 ± 0.1	-5.2 ± 0.1
<b>Proteine con funzione sconosciuta</b>								
<b>9</b>	P0047B08.14 protein	81	Q-ToF\	<i>Oryza sativa</i>	Q94J98	-	-2.1 ± 0.1	-3.3 ± 0.1
<b>11</b>	Hypothetical protein P0544H11.36	94	Q-ToF	<i>Oryza sativa</i>	Q6Z6D0	-	ND in chitosano	ND in chitosano
<b>12</b>	Hypothetical protein At3g08030/F17A17.37	79	Q-ToF	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Q9SFB1	-2.4 ± 0.1	-5.4 ± 0.1	-2.3 ± 0.1
<b>56</b>	AT3g13360/MDC11_15	78	MALDI- ToF	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Q94AV5	4.1 ± 0.1	4.9 ± 0.1	-

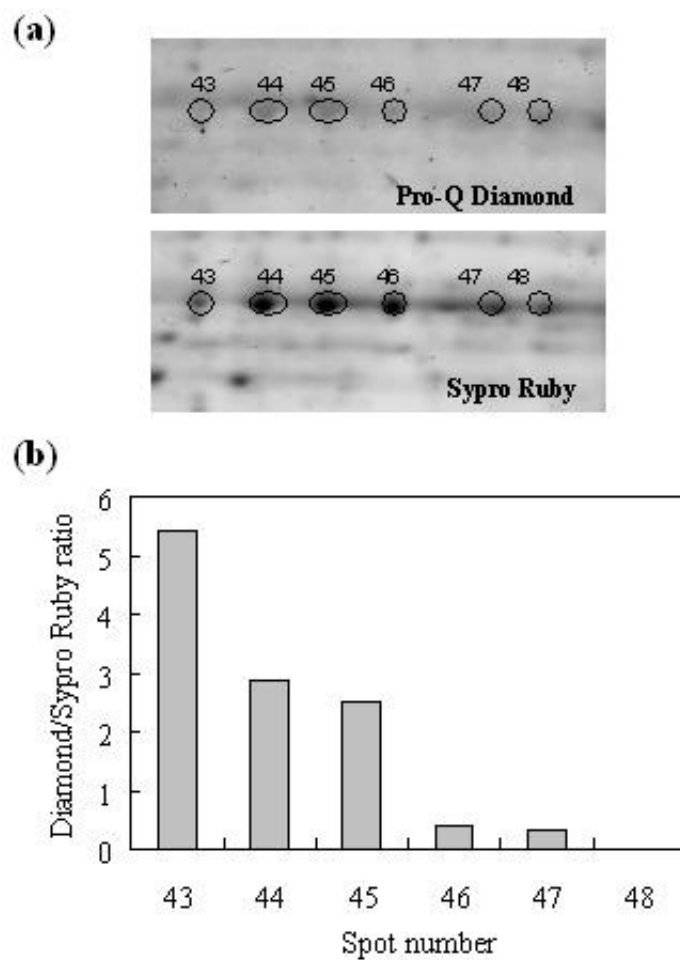
<sup>a</sup>, Il Mowse scores è significativo quando è maggiore delle seguenti soglie: MALDI-ToF >65; MALDI-MSMS >65; Q-ToF >39; DNVS >60.  
<sup>b</sup>, la variazione rappresenta la media ± SD di due differenti gel per i due controlli ed il trattamento.  
<sup>c</sup>, risultato confermato da due o più tecniche. In Tabella 1 è riportata la tecnica con il Mowse score relativo maggiore.  
DNVS, sequenziamento *de novo*; FC, (fold change) variazione della quantità di proteina; ND, non determinabile; (-), variazione -2<FC<+2.

Nove proteine sono coinvolte nella via biosintetica degli stilbeni o di composti correlati: sei sono state identificate come stilbene sintasi 1 di *V. vinifera* (STS *Vst1*), l'enzima biosintetico del resveratrolo, due come calcone-flavanone isomerasi di *V. vinifera*, che devia la via dai calconi ai flavoni ed agli antociani, ed una è una perossidasi di classe III, implicata nella via biosintetica della lignina, un ramo laterale della via dei fenilpropanoidi. Tutte queste proteine sono state accumulate maggiormente in seguito al trattamento con chitosano, ma non sono state influenzate dall'acido acetico, con l'eccezione della perossidasi di classe III che diminuisce (Figura 19 spot 19 e Tabella 1). In particolare, le proteine stilbene sintasi sono state fortemente indotte dal chitosano, con un aumento variabile fra le 3,2 e le 10,1 volte rispetto al controllo con acido acetico (Figura 19d-f, spots 43-48, Tabella 1). L'identità degli spots che corrispondono alle STS è stata confermata sequenziando *de novo* i peptidi QEITAEVPR (amminoacidi 95-104) e LANLLGLETSVR (amminoacidi 144-155), che sono assenti nella calcone sintasi (CHS), enzima altamente omologo alla STS. Le proteine STS, tutte codificate dal gene *Vst1*, compaiono come treno di sei spot distinti sui gel 2D (Figura 19d-f, spots 43-48, Tabella 1) a causa del loro differente grado di fosforilazione (Figura 20a e 20b per le cellule trattate con chitosano). Infatti, l'aggiunta di uno o più gruppi fosfato cambia il punto isoelettrico della proteina ma non il suo peso molecolare (Figura 20a), traslando il pI dello spot verso valori acidi (spot 43, più alto grado di fosforilazione, pI più basso; spot 48 non fosforilato, pI più alto, Figura 20b). Un simile profilo di fosforilazione è stato osservato anche nei campioni di controllo con acido acetico e acqua.

Quattordici proteine identificate sono risultate coinvolte in altri meccanismi di difesa (risposte a patogeni o a stress ossidativo), di cui undici sono proteine pathogenesis-related 10 (PR-10) di *Vitis* (Tabella 1). In generale, queste proteine sono accumulate maggiormente nelle cellule trattate con chitosano rispetto a quelle addizionate del solo acido acetico.

Le altre 29 proteine identificate appartengono al metabolismo primario: trascrizione del DNA e processamento di mRNA e proteine (13 proteine), metabolismo energetico (11 proteine), metabolismo degli amminoacidi (3 proteine) ed altri (2 proteine) (Tabella 1). Nella maggioranza dei casi, la quantità di queste proteine diminuisce in seguito al trattamento con chitosano. Inoltre, contrariamente a quanto avviene per i meccanismi di difesa, anche l'acido acetico produce un effetto sulle proteine del metabolismo primario.





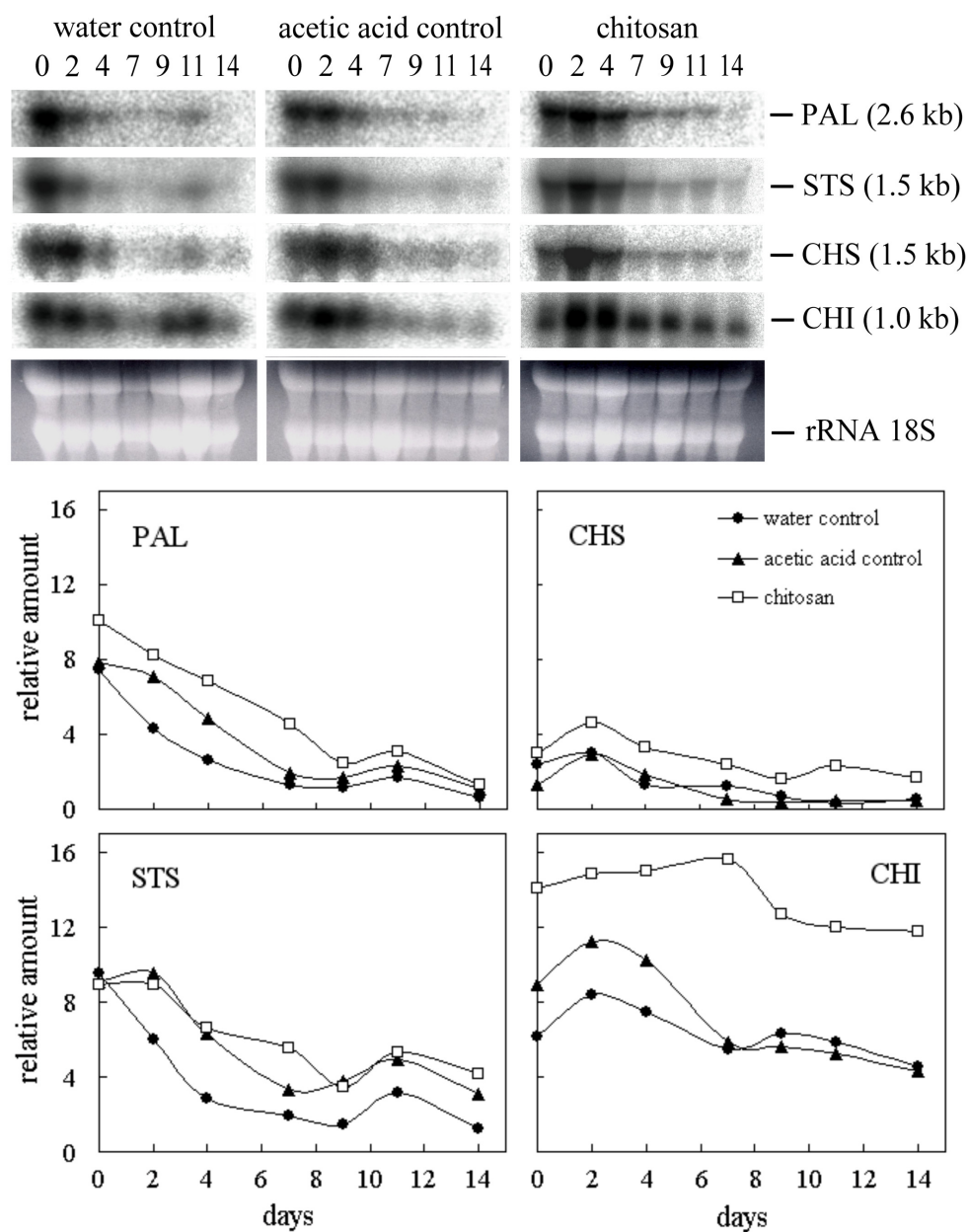
**Figura 20.** Livelli di fosforilazione della proteina stilbene sintasi (STS) di cellule di Barbera (*Vitis vinifera*) trattate con chitosano 50 µg/mL. (a) Ingrandimento dell'area di gel con gli spot di STS marcati col colorante Pro-Q Diamond specifico per le fosfoproteine e con Sypro Ruby fluorescente. I numeri si riferiscono alle proteine identificate mostrate in Figura 19 e nella Tabella 1. Due repliche biologiche con due replicati tecnici sono stati eseguiti per ogni campione ottenendo risultati simili.

### 3. ANALISI TRASCRIZIONALI TRAMITE NORTHERN BLOT

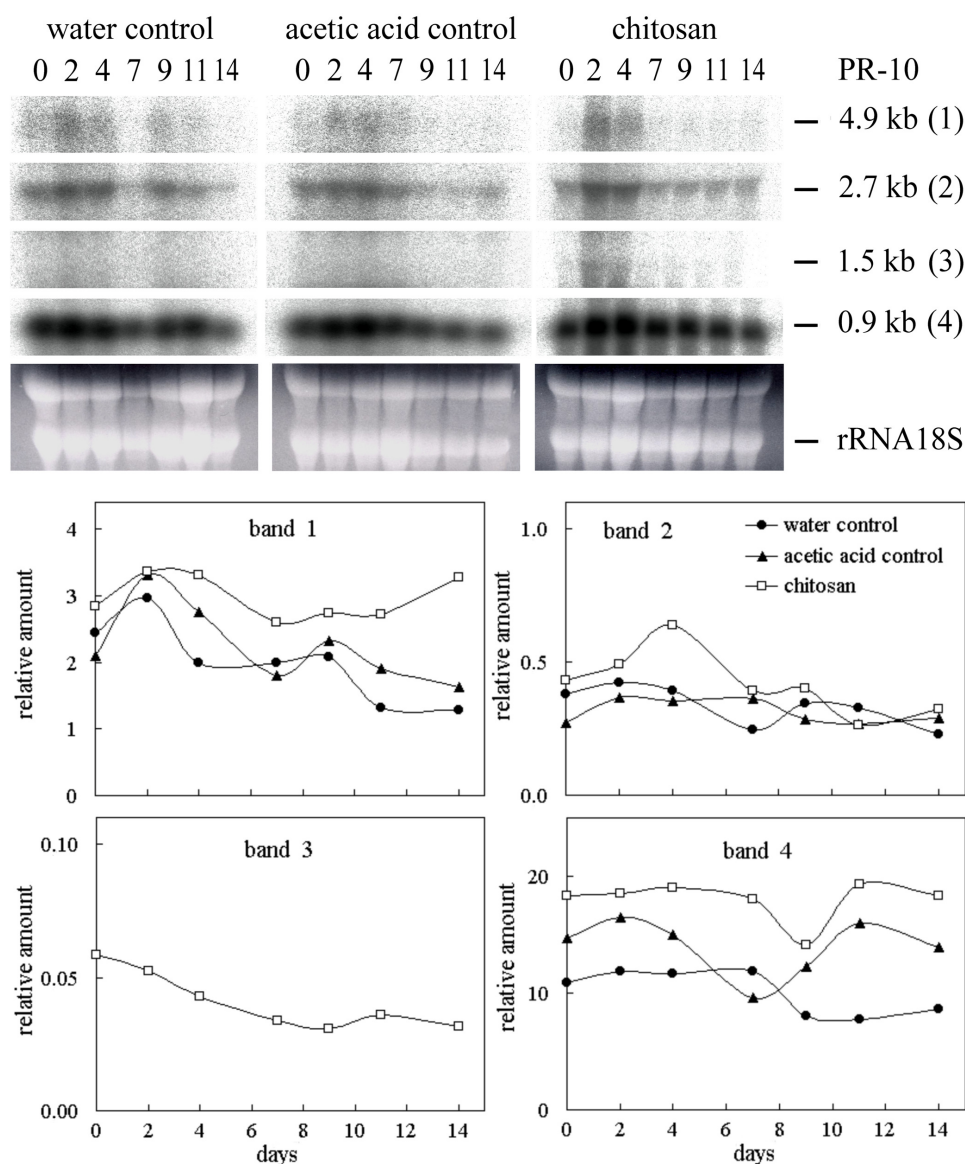
Tramite northern blot sono state eseguite analisi trascrizionali su RNA estratto dalle cellule trattate con chitosano 50 µg/mL, con acido acetico 0,01% (v/v) e non trattate, campionate ai giorni 0, 2, 4, 7, 9, 11 e 14 di coltura. Sono state utilizzate sonde omologhe di vite per i trascritti di fenilalanina ammonio liasi (PAL), stilbene sintasi (STS), calcione sintasi (CHS), calcione isomerasi (CHI), proteina pathogenesis-related 10 (PR-10).

L'espressione della PAL decresce progressivamente a partire dal giorno 0 (Figura 21) nelle colture trattate e in entrambi i controlli. Le cellule trattate con chitosano hanno un livello di mRNA di PAL leggermente maggiore durante tutto il periodo della coltura. La trascrizione della STS diminuisce durante la prima settimana di coltura, mostrando una quantità un po' più elevata di trascritto nelle cellule trattate con chitosano e nel controllo con acido acetico e con un secondo piccolo picco di espressione rilevato al giorno 11 (Figura 21). Il trattamento con chitosano elicitava l'espressione della CHS con un picco al giorno 2 seguito da una diminuzione progressiva dei livelli di trascrizione (Figura 21). L'espressione della CHI è stata significativamente incrementata dal trattamento con chitosano durante tutto il periodo di osservazione (Figura 21).

L'ibridazione con la sonda PR-10 ha rivelato quattro serie di trascritti con peso molecolare diverso (bande 1-4, Figura 22). Gli mRNA 1, 2 e 4 vengono sovra-espressi in seguito al trattamento con chitosano, mentre la banda 3 è comparsa specificamente in risposta al trattamento con l'elicettore.



**Figura 21.** Analisi di espressione tramite northern blot di alcuni geni codificanti per enzimi della via biosintetica dei fenilpropanoidi, nelle colture di cellule di Barbera (*Vitis vinifera*) trattate con chitosano 50 µg/mL (chitosan) e nelle relative colture controllo in acido acetico 0,01 % (v/v) (acetic acid control) e non trattate (water control). Fenilalanina ammonio liasi (PAL); stilbene sintasi (STS); calcone sintasi (CHS); calcone-flavanone isomerasi (CHI). L'intensità relativa dei segnali di ciascun trascritto è stata ottenuta dopo aver normalizzato per il segnale di caricamento dell'rRNA 18S. Gli esperimenti sono stati replicati due volte con simili risultati.

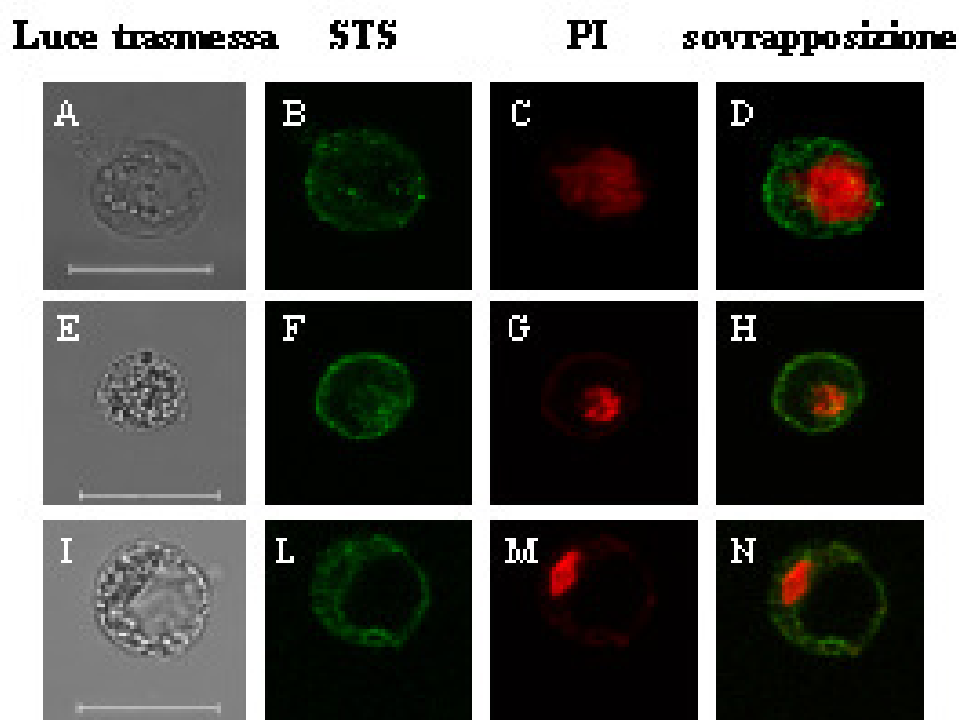


**Figura 22.** Analisi di espressione tramite northern blot del gene pathogenesis-related 10 (PR-10) nelle colture di cellule di Barbera (*Vitis vinifera*) trattate con chitosano 50 µg/mL (chitosan) e nelle relative culture controllo in acido acetico 0,01 % (v/v) (acetic acid control) e non trattate (water control). Sono stati determinati quattro differenti trascritti (bande 1-4) e l'intensità relativa dei loro segnali è stata ottenuta dopo aver normalizzato per il segnale di caricamento dell'rRNA 18S. Gli esperimenti sono stati replicati due volte con simili risultati.

#### 4. IMMUNOLocalIZZAZIONE DELL'ENZIMA STS

L'immunolocalizzazione dell'enzima stilbene sintasi (STS) è stata eseguita su protoplasti ottenuti da 4 tipi di colture: cellule di picciolo di Barbera non trattate, trattate con acido acetico 0,01% (v/v), trattate con chitosano 50 µg/mL, cellule ottenuta da bacca di Barbera non trattate.

Le osservazioni al microscopio confocale hanno mostrato come non vi siano differenze di localizzazione dell'enzima dovute ai trattamenti (Figura 23) o all'espianto di origine. I controlli negativi non hanno mostrato una marcatura evidente. La STS è soprattutto associata al lato citosolico della membrana plasmatica, alla membrana del tonoplasto ed in minima parte è dispersa nel citoplasma. Sembra non essere presente all'interno dei vacuoli e nel nucleo (Figura 23).



**Figura 23.** Immunolocalizzazione dell'enzima stilbene sintasi (STS) in protoplasti ottenuti dalle colture di cellule di Barbera (*Vitis vinifera*) trattate con chitosano 50 µg/mL e delle relative colture controllo in acido acetico 0,01 % (v/v) e non trattate. Immagini al microscopio confocale di una sezione interna di protoplasti marcati con anticorpi primari anti-STs (verde) e con propidio ioduro (PI) (rosso). (a)/(d) controllo acqua; (e)/(h) controllo con acido acetico; (i)/(n) protoplasti trattati con chitosano 50 µg/mL. Le barre in (a)/(n) corrispondono a 50 µm. Gli esperimenti sono stati ripetuti due volte con simili risultati e sono stati svolti anche su protoplasti ottenuti da colture non trattate da bacca ottenendo risultati analoghi.

## 5. ANALISI PROTEOMICHE SU FRAZIONI SUBCELLULARI

Dalle sospensioni di cellule di Barbera (*Vitis vinifera*) trattate con chitosano 50 µg/mL e dai due controlli, campionate al quarto giorno di coltura (giorno di massima produzione del *trans*-resveratrolo, Figura 14), sono state isolate le frazioni subcellulari citosoliche e dei membrane microsomiali da cui sono state estratte le proteine che sono poi state separate tramite elettroforesi 2D (Figure 24 e 25). Di ogni trattamento sono state eseguite due repliche tecniche di due replicati biologici, ottenendo risultati simili.

Sono stati presi in considerazione solo gli spots che mostravano una variazione in accumulo di proteina pari o superiore al fattore 2 nel confronto fra coppie di gel (Figure 24 e 25). In totale sono stati analizzati con spettrometria di massa 125 spots, di cui 55 provenienti da gel di proteine solubili e 70 da gel di frazioni di membrana. Di tutti è stato ottenuto il fingerprint tramite MALDI-ToF e la successiva frammentazione in spettrometria di massa tandem (MALDI-MSMS). Questi dati sono stati utilizzati per la ricerca in banca dati SPTrEMBL utilizzando il motore di ricerca Mascot. Sui campioni proteici non identificati o identificati in maniera non univoca, sono state ripetute entrambe le analisi e la ricerca con Mascot, ed i pochi su cui persistevano dei dubbi sono stati anche analizzati con l'ESI-QToF.

L'identificazione delle proteine di vite il cui accumulo risente del trattamento con chitosano o con acido acetico (suo solvente) ha dato ottimi risultati: il 90% delle proteine sono state identificate. Infatti su 55 proteine solubili analizzate 53 sono state identificate, e su 70 proteine provenienti dalle frazioni di membrana, 59 sono state identificate. Le proteine identificate sono elencate nelle Tabelle 2 e 3. La maggioranza di queste proteine, quindi, è presente nella frazione subcellulare microsomiale, cioè si tratta di proteine di membrana o associate alle membrane cellulari.

Fra le proteine della frazione solubile identificate (Tabella 2), vi sono 3 stilbene sintasi 1 di *Vitis vinifera* (STS *Vst1*), l'enzima biosintetico del resveratrolo, ed il loro accumulo sembra essere leggermente stimolato dall'acido acetico e dal chitosano rispetto al controllo in acqua, ma non dal chitosano rispetto al controllo con acido acetico (Figura 24, spots 3, 21 e 22). Vi sono inoltre 6 PR-10 di *V. vinifera*, codificate da 2 differenti isoforme geniche (Figura 24, PR-10.1 spots 46 e 47; PR-10.2 spots 17, 43-45), che hanno risposto in maniera diversa ai trattamenti: la quantità di alcune è aumentata a causa dell'acido acetico (spots 17 e 43) o del chitosano (spot 46) o di entrambi (spot 45) ed in due casi sono diminuite con l'acido acetico e

nuovamente aumentate col chitosano (spots 44 e 47). Altre 3 proteine appartengono ad altri meccanismi di difesa della pianta che le cellule sembrano aver messo in atto per rispondere all'acido acetico e non al chitosano. Inoltre 19 proteine identificate appartengono ai metabolismi primari: processamento delle proteine (2 proteine), metabolismi energetici (9 proteine), metabolismo degli amminoacidi (5 proteine) ed altri (3 proteine). Nella maggioranza dei casi, la quantità di queste proteine non varia in seguito al trattamento con chitosano rispetto al controllo con acido acetico, mentre cala o cresce in risposta al solo acido, tanto che in 6 casi la proteina è assente nelle cellule non trattate. Infine 22 polipeptidi sono stati identificati come “putative uncharacterized protein”, cioè sono stati riconosciuti come codificati da geni di *Vitis vinifera* ma con funzione sconosciuta.

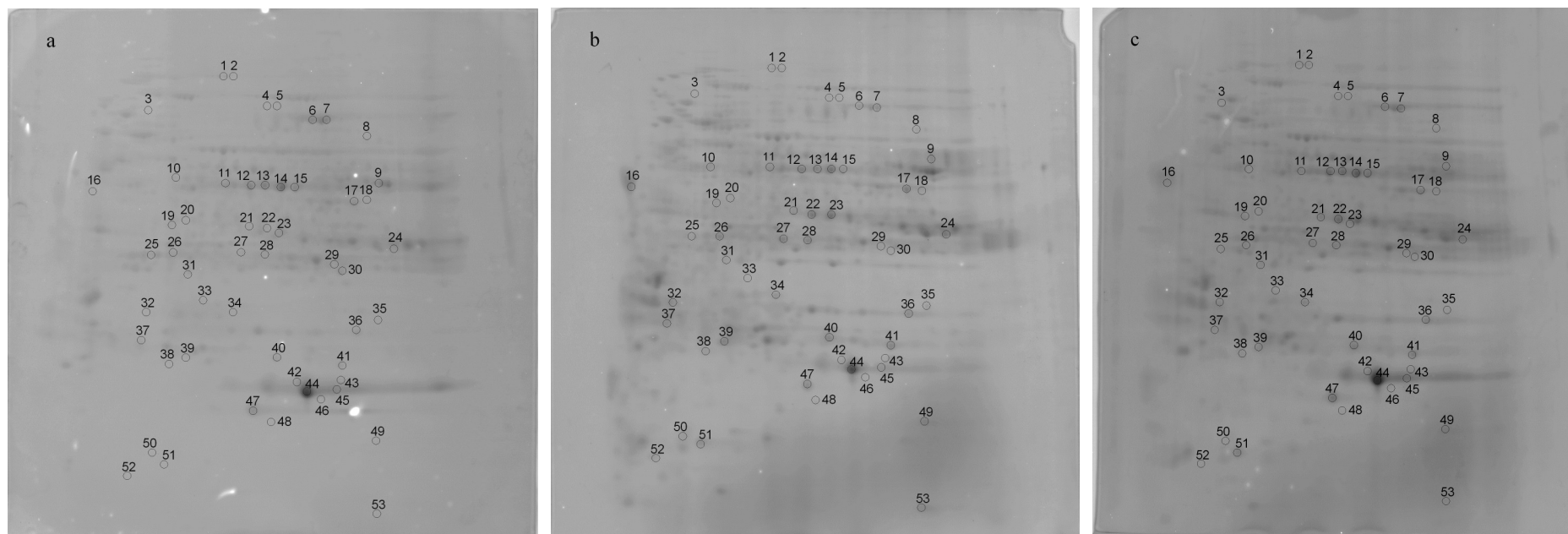
Diversi treni di spots sono stati identificati (Figura 24 e Tabella 2): 2 STS (spots 21-22), 4 adenosilomocisteinasi (spots 11-14) e 3 coppie di putative uncharacterized protein (spots 1-2, 4-5, 6-7). Probabilmente si tratta di proteine con un diverso grado di fosforilazione, come si era verificato tramite colorazione specifica per le 6 STS individuate sui gel degli estratti proteici totali (Figura 20). È possibile che i treni comprendano più proteine di quelle analizzate, ma che non variano coi trattamenti eseguiti.

Fra le proteine della frazione di membrana variata a seguito dei trattamenti ed identificate (Tabella 3), vi sono 4 stilbene sintasi 1 di *V. vinifera* (STS *Vst1*), di cui 2 sono state accumulate maggiormente in seguito al trattamento con chitosano rispetto ad entrambi i controlli (Figura 25, spots 23 e 26) e 2 sono state influenzate dal solo acido acetico (Figura 25, spots 24 e 25). Una STS è forse codificata da una diversa isoforma genica (Figura 25, spots 26) ed è l'unica assente nelle cellule non trattate ed è quella la cui quantità aumenta maggiormente (6 volte) a causa del chitosano. Ad altri meccanismi di difesa della pianta appartengono 9 polipeptidi: 3 PR-10 codificate da uno stesso gene (sono PR-10.2) e aumentate fino a 33 volte in risposta all'acido acetico (Figura 25, spots 51, 57 e 58), 3 isoforme di catalasi (Figura 25, spots 14-16) e 3 altre proteine. Di tutte cresce la quantità trattando le cellule con l'acido acetico e solo di una perossidasi (Figura 25, spot 36) si osserva un aumento indotto dal chitosano. Altre 22 proteine identificate appartengono ai metabolismi primari: trascrizione del DNA e processamento di mRNA e proteine (5 proteine), metabolismi energetici (6 proteine), metabolismo degli amminoacidi (3 proteine) ed altri (8 proteine). Generalmente il loro accumulo cala o non varia nelle cellule trattate con chitosano, mentre è più variegato l'effetto dell'acido acetico. Inoltre sono state identificate 5 proteine facenti parte di canali transmembrana di diverse membrane cellulari, o associate ad essi, che risentono in

vario modo dei trattamenti con acido acetico e/o con chitosano (Figura 25, spots 2, 28, 45, 48 e 49). Infine 19 proteine sono state identificate come “putative uncharacterized protein”, cioè come polipetidi codificati da geni di *Vitis vinifera* ma con funzione sconosciuta.

Le proteine individuate in treni di spots nei gel di frazioni di membrana (Figura 25 e Tabella 3) sono state più numerose che nelle frazioni solubili: 4 STS (spots 23-26), 3 catalasi (spots 14-16), 3 proteine acido P0 della subunità ribosomiale 60S (spots 39-41), 2 proteine similporine della membrana mitocondriale esterna (spots 48-49), 2 putative  $\beta$ -D-xilosidasi e 2 putative uncharacterized protein (spots 5-6). Probabilmente si tratta di proteine con un diverso grado di fosforilazione, come si era verificato tramite colorazione specifica per le 6 STS individuate sui gel degli estratti proteici totali (Figura 20). Le proteine analizzate sono solo quelle che variano coi trattamenti, quindi è possibile che i treni comprendano più proteine di quelle individuate.





**Figura 24.** Analisi proteomiche delle colture di cellule di Barbera (*Vitis vinifera*) trattate con chitosano 50  $\mu\text{g/mL}$  e delle relative colture controllo in acido acetico 0,01 % e non trattate. Gli estratti proteici delle frazioni solubili di cellule al giorno 4 sono stati separati su gel 2D. (a) Controllo non trattato. (b) Controllo con acido acetico 0,01 % (v/v). (c) Cellule trattate con chitosano 50  $\mu\text{g/mL}$ . I numeri si riferiscono alle proteine identificate elencate nella Tabella 2; le proteine non identificate non sono mostrate. Due repliche biologiche con due replicati tecnici sono stati eseguiti per ogni campione ottenendo risultati simili.

**Tabella 2.** Proteine identificate con spettrometria di massa dopo separazione elettroforetica 2D delle frazioni subcellulari solubili isolate da colture di *Vitis vinifera* (cv. Barbera) campionate al quarto giorno di coltura controllo acqua, controllo acido acetico 0,01 % (v/v) e trattamento con chitosano 50 µg/mL.

Numero spot	Proteina	Mowse score <sup>a</sup>	Tecnica	Organismo	SwissProt accession number	FC <sup>b</sup> ac.ac./acqua	FC <sup>b</sup> chit./acqua	FC <sup>b</sup> chit./ac.ac.
<b>Vie biosintetiche di stilbeni e composti correlati</b>								
<b>3</b>	Stilbene synthase 1 (EC 2.3.1.95)	228	MALDI-MSMS <sup>c</sup>	<i>Vitis vinifera</i>	P28343	ND in acqua	ND in acqua	-
<b>21</b>	Stilbene synthase 1 (EC 2.3.1.95)	268	MALDI-MSMS <sup>c</sup>	<i>Vitis vinifera</i>	P28343	2,4 ± 0,2	2,8 ± 0,2	-
<b>22</b>	Stilbene synthase 1 (EC 2.3.1.95)	306	MALDI-MSMS <sup>c</sup>	<i>Vitis vinifera</i>	P28343	2,8 ± 0,1	3,2 ± 0,1	-
<b>Altri meccanismi di difesa</b>								
<b>16</b>	Apoplastic anionic gaiacol peroxidase (EC 1.11.1.7)	93	Q-Tof <sup>c</sup>	<i>Gossypium hirsutum</i>	Q8RVP3	132,0 ± 0,7	ND in chitosano	ND in chitosano
<b>17</b>	Pathogenesis-related protein 10 (PR10.2)	120	MALDI-ToF <sup>c</sup>	<i>Vitis vinifera</i>	Q9FS43	ND in acqua	ND in acqua	-
<b>20</b>	Cationic peroxidase 1 precursor (EC 1.11.1.7)	77	Q-Tof	<i>Arachis ipogaea</i>	P22195	ND in acqua	ND in acqua	-
<b>32</b>	Class IV endochitinase (EC 3.2.1.14)	123	MALDI-MSMS <sup>c</sup>	<i>Vitis vinifera</i>	O24530	2,9 ± 0,1	2,5 ± 0,2	-
<b>43</b>	Pathogenesis-related protein 10 (PR10.2)	100	MALDI-ToF	<i>Vitis vinifera</i>	Q9FS43	ND in acqua	ND in acqua e chitosano	ND in chitosano
<b>44</b>	Pathogenesis-related protein 10 (PR10.2)	404	MALDI-MSMS <sup>c</sup>	<i>Vitis vinifera</i>	Q9FS43	-2,6 ± 0,5	-1,5 ± 0,5	1,7 ± 0,5

45	Pathogenesis-related protein 10 (PR10.2)	423	MALDI-MSMS <sup>c</sup>	<i>Vitis vinifera</i>	Q9FS43	ND in acqua	ND in acqua	2,6 ± 0,5
46	Pathogenesis-related protein 10 (PR10.1)	146	MALDI-ToF <sup>c</sup>	<i>Vitis vinifera</i>	Q9FS42	ND in acqua e ac.acetico	ND in acqua	ND in ac.acetico
47	Pathogenesis-related protein 10 (PR10.1)	430	MALDI-MSMS <sup>c</sup>	<i>Vitis vinifera</i>	Q9FS42	-2,7 ± 0,5	-1,3 ± 0,5	2,1 ± 0,2
<b>Processamento delle proteine</b>								
35	Proteasome subunit α type (EC 3.4.25.1)	128	MALDI-MSMS <sup>c</sup>	<i>Vitis vinifera</i>	A5BFH7	ND in acqua	ND in acqua	-
53	Ubiquitin-60S ribosomal L40 fusion protein	227	MALDI-MSMS <sup>c</sup>	<i>Vitis vinifera</i>	Q3KN73	2,0 ± 0,3	ND in chitosano	ND in chitosano
<b>Metabolismo energetico</b>								
8	Formate-tetrahydrofolate ligase (EC 6.3.4.3)	59	MALDI-MSMS	<i>Medicago truncatula</i>	Q1SCS3	ND in acqua	ND in acqua e chitosano	ND in chitosano
10	ATP synthase subunit β (EC 3.6.3.14)	245	MALDI-ToF <sup>c</sup>	<i>Vitis vinifera</i>	A5AYU8	3,1 ± 0,1	1,9 ± 0,1	-
18	6-phosphogluconate dehydrogenase (EC 1.1.1.44)	133	MALDI-MSMS <sup>c</sup>	<i>Vitis vinifera</i>	A5B7A4	ND in acqua	ND in acqua	-
23	Mixture: Phosphoglycerate kinase (EC 2.7.2.3) + Alcohol dehydrogenase 6 (EC 1.1.1.-)	336	MALDI-ToF <sup>c</sup>	<i>Vitis vinifera</i> + <i>Vitis vinifera</i>	A5CAF6 + Q9M6B5	2,8 ± 0,1	3,2 ± 0,1	-
24	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (Fragment)	276	MALDI-MSMS <sup>c</sup>	<i>Vitis vinifera</i>	A2ICC7	ND in acqua	ND in acqua	-
30	Malate dehydrogenase (EC 1.1.1.37)	428	MALDI-MSMS <sup>c</sup>	<i>Vitis vinifera</i>	Q9M6B3	6,9 ± 0,4	-	-6,0 ± 0,4
36	Triose-phosphate isomerase (EC 5.3.1.1)	383	MALDI-MSMS <sup>c</sup>	<i>Vitis vinifera</i>	A5BV65	5,4 ± 0,1	4,5 ± 0,2	-

38	GTP-binding protein	92	MALDI-ToF	<i>Pisum sativum</i>	Q08153	ND in acqua	ND in acqua	-6,0 ± 0,1
40	Putative quinone reductase (EC 1.6.5.5) (Fragment)	137	MALDI-MSMS <sup>c</sup>	<i>Vitis vinifera</i>	Q6YCG4	4,0 ± 0,4	3,0 ± 0,1	-
<b>Metabolismo degli amminoacidi</b>								
11	Adenosylhomocysteinase (EC 3.3.1.1)	80	Q-Tof	<i>Vitis vinifera</i>	A5C5K3	ND in acqua	ND in acqua	-
12	Adenosylhomocysteinase (EC 3.3.1.1)	178	MALDI-MSMS <sup>c</sup>	<i>Vitis vinifera</i>	A5C5K3	-2,2 ± 0,1	-1,7 ± 0,1	-
13	Adenosylhomocysteinase (EC 3.3.1.1)	210	MALDI-MSMS <sup>c</sup>	<i>Vitis vinifera</i>	A5C5K3	-2,1 ± 0,1	-	-
14	Adenosylhomocysteinase (EC 3.3.1.1)	272	MALDI-MSMS <sup>c</sup>	<i>Vitis vinifera</i>	A5C5K3	-2,5 ± 0,2	-1,7 ± 0,2	-
15	Glutamate decarboxylase 1 (EC 4.1.1.15)	210	MALDI-MSMS	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Q42521	-2,0 ± 0,1	-	-
<b>Altre proteine</b>								
25	Serine/threonine protein phosphatase (EC 3.1.3.16)	96	MALDI-ToF	<i>Pisum sativum</i>	Q8LSN3	3,2 ± 0,1	-	-2,5 ± 0,1
31	β-1,3-glucanase (EC 3.2.1.6) (Fragment)	94	MALDI-MSMS	<i>Vitis vinifera</i>	O24551	7,8 ± 0,1	7,9 ± 0,1	-
49	Nucleoside diphosphate kinase (EC 2.7.4.6)	201	MALDI-MSMS <sup>c</sup>	<i>Vitis vinifera</i>	A5B878	ND in acqua	ND in acqua	-
<b>Proteine con funzione sconosciuta</b>								
1	Putative uncharacterized protein	150	MALDI-MSMS <sup>c</sup>	<i>Vitis vinifera</i>	A5AFM3	ND in ac.acetico	-	ND in ac.acetico

<b>2</b>	Putative uncharacterized protein	151	MALDI-MSMS <sup>c</sup>	<i>Vitis vinifera</i>	A5AFM3	ND in acqua	ND in acqua	-
<b>4</b>	Putative uncharacterized protein	236	MALDI-ToF <sup>c</sup>	<i>Vitis vinifera</i>	A5C8X4	ND in acqua	ND in acqua e chitosano	ND in chitosano
<b>5</b>	Putative uncharacterized protein	101	MALDI-ToF	<i>Vitis vinifera</i>	A5C8X4	ND in acqua	ND in acqua e chitosano	ND in chitosano
<b>6</b>	Putative uncharacterized protein	285	MALDI-MSMS <sup>c</sup>	<i>Vitis vinifera</i>	A5C7K7	ND in ac.acetico	-	ND in ac.acetico
<b>7</b>	Putative uncharacterized protein	381	MALDI-MSMS <sup>c</sup>	<i>Vitis vinifera</i>	A5C7K7	ND in acqua	ND in acqua	2,4 ± 0,1
<b>9</b>	Putative uncharacterized protein	79	Q-Tof	<i>Vitis vinifera</i>	A5BUD0	3,6 ± 0,1	-	-2,4 ± 0,1
<b>19</b>	Putative uncharacterized protein	147	MALDI-ToF <sup>c</sup>	<i>Vitis vinifera</i>	A5AHG5	2,1 ± 0,1	-	-
<b>26</b>	Putative uncharacterized protein	153	MALDI-MSMS <sup>c</sup>	<i>Vitis vinifera</i>	A5AFA5	ND in acqua	ND in acqua e chitosano	ND in chitosano
<b>27</b>	Putative uncharacterized protein	79	MALDI-MSMS	<i>Vitis vinifera</i>	A5B7S5	8,2 ± 0,1	3,5 ± 0,1	-2,4 ± 0,2
<b>28</b>	Putative uncharacterized protein	75	MALDI-MSMS	<i>Vitis vinifera</i>	A5B7S5	2,7 ± 0,1	-	-2,0 ± 0,1
<b>29</b>	Putative uncharacterized protein	186	MALDI-MSMS <sup>c</sup>	<i>Vitis vinifera</i>	A54Q52	-3,2 ± 0,1	-	2,7 ± 0,1
<b>33</b>	Putative uncharacterized protein	75	MALDI-MSMS <sup>c</sup>	<i>Vitis vinifera</i>	A5AXN3	3,5 ± 0,1	2,3 ± 0,1	-
<b>34</b>	Putative uncharacterized protein	54	MALDI-MSMS	<i>Vitis vinifera</i>	A5C344	2,1 ± 0,1	ND in chitosano	ND in chitosano
<b>37</b>	Putative uncharacterized protein	222	MALDI-MSMS <sup>c</sup>	<i>Vitis vinifera</i>	A5B5W6	-	-	-2,4 ± 0,1

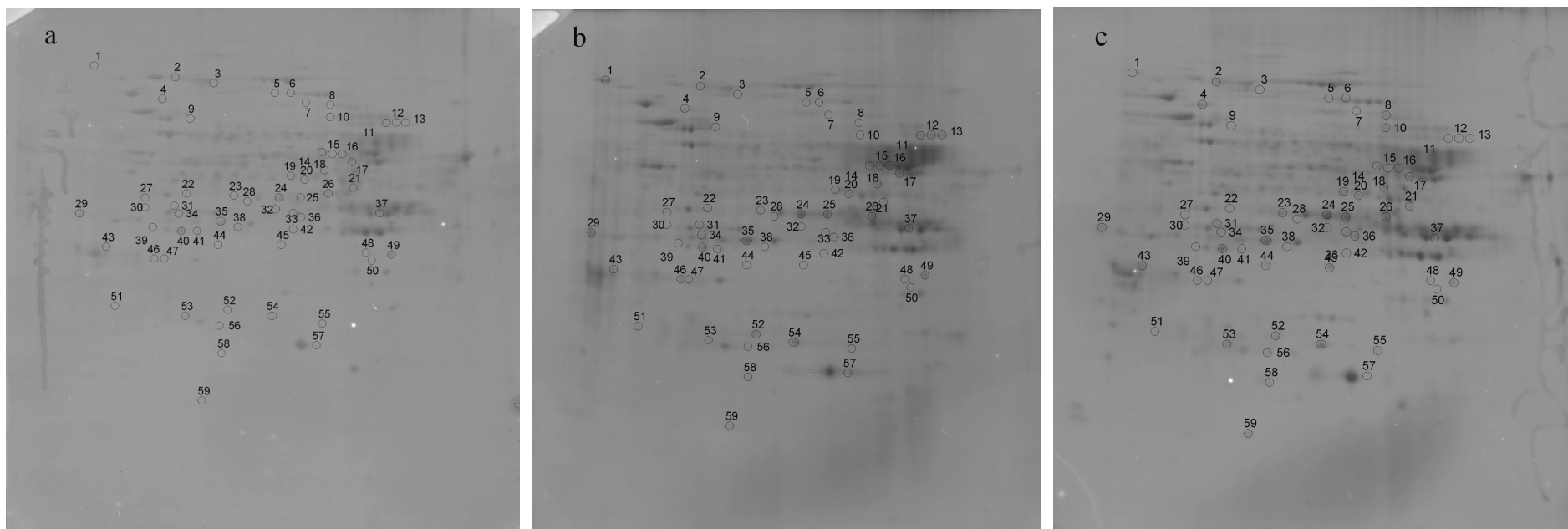
<b>39</b>	Putative uncharacterized protein	106	MALDI-MSMS <sup>c</sup>	<i>Vitis vinifera</i>	A5BCQ0	2,3 ± 0,3	-	-
<b>41</b>	Putative uncharacterized protein	88	MALDI-MSMS	<i>Vitis vinifera</i>	A5BCQ0	4,2 ± 0,1	4,6 ± 0,1	-
<b>42</b>	Putative uncharacterized protein	124	MALDI-MSMS <sup>c</sup>	<i>Oryza sativa subsp. Indica</i>	A2WN83	ND in acqua	ND in acqua e chitosano	ND in chitosano
<b>48</b>	Putative uncharacterized protein	144	MALDI-MSMS	<i>Vitis vinifera</i>	A5C850	-	ND in chitosano	ND in chitosano
<b>50</b>	Putative uncharacterized protein	84	MALDI-MSMS	<i>Vitis vinifera</i>	A5BFN7	ND in acqua	ND in acqua	-
<b>51</b>	Putative uncharacterized protein	100	MALDI-MSMS <sup>c</sup>	<i>Vitis vinifera</i>	A5AML5	5,9 ± 0,1	8,5 ± 0,1	-
<b>52</b>	Putative uncharacterized protein	54	MALDI-MSMS	<i>Vitis vinifera</i>	A5C344	4,9 ± 0,1	ND in chitosano	ND in chitosano

<sup>a</sup>, Il Mowse scores è significativo quando è maggiore delle seguenti soglie: MALDI-ToF >69; MALDI-MSMS >40; Q-ToF >39.

<sup>b</sup>, la variazione rappresenta la media ± SD di due differenti gel per i due controlli ed il trattamento.

<sup>c</sup>, risultato confermato da due o più tecniche. In Tabella 2 è riportata la tecnica con il Mowse score relativo maggiore.

FC, (fold change) variazione della quantità di proteina; ND, non determinabile; (-), variazione -2<FC<+2.



**Figura 25.** Analisi proteomiche delle colture di cellule di Barbera (*Vitis vinifera*) trattate con chitosano 50 µg/mL e delle relative colture controllo in acido acetico 0,01 % e non trattate. Gli estratti proteici delle frazioni di membrana di cellule al giorno 4 sono stati separati su gel 2D. (a) Controllo non trattato. (b) Controllo con acido acetico 0,01 % (v/v). (c) Cellule trattate con chitosano 50 µg/mL. I numeri si riferiscono alla proteine identificate elencate nella Tabella 3; le proteine non identificate non sono mostrate. Due repliche biologiche con due replicati tecnici sono stati eseguiti per ogni campione ottenendo risultati simili.

**Tabella 3.** Proteine identificate con spettrometria di massa dopo separazione elettroforetica 2D delle frazioni subcellulari di membrana isolate da colture di *Vitis vinifera* (cv. Barbera) campionate al quarto giorno di coltura controllo acqua, controllo acido acetico 0,01 % (v/v) e trattamento con chitosano 50 µg/mL.

Numero spot	Proteina	Mowse score <sup>a</sup>	Tecnica	Organismo	SwissProt accession number	FC <sup>b</sup> ac.ac./acqua	FC <sup>b</sup> chit./acqua	FC <sup>b</sup> chit./ac.ac.
<b>Vie biosintetiche di stilbeni e composti correlati</b>								
<b>23</b>	Stilbene synthase 1 (EC 2.3.1.95)	93	MALDI-MSMS <sup>c</sup>	<i>Vitis vinifera</i>	P28343	1,9 ± 0,2	3,6 ± 0,2	1,9 ± 0,1
<b>24</b>	Stilbene synthase 1 (EC 2.3.1.95)	138	MALDI-MSMS <sup>c</sup>	<i>Vitis vinifera</i>	P28343	3,4 ± 0,2	4,2 ± 0,1	-
<b>25</b>	Stilbene synthase 1 (EC 2.3.1.95)	283	MALDI-MSMS <sup>c</sup>	<i>Vitis vinifera</i>	P28343	3,9 ± 0,3	4,9 ± 0,2	-
<b>26</b>	Stilbene synthase 1 (EC 2.3.1.95)	88	MALDI-MSMS <sup>c</sup>	<i>Vitis vinifera</i>	Q8LPP4	ND in acqua	ND in acqua	6,0 ± 0,1
<b>Altri meccanismi di difesa</b>								
<b>14</b>	Catalase (EC 1.11.1.6)	192	MALDI-ToF	<i>Vitis vinifera</i>	Q8S568	3,7 ± 0,4	2,6 ± 0,4	-
<b>15</b>	Catalase (EC 1.11.1.6)	265	MALDI-ToF <sup>c</sup>	<i>Vitis vinifera</i>	Q8S568	ND in acqua	ND in acqua	-
<b>16</b>	Catalase (EC 1.11.1.6)	108	MALDI-MSMS	<i>Vitis vinifera</i>	Q8S568	ND in acqua	ND in acqua	-6,6 ± 0,6
<b>36</b>	Haem peroxidase, plant/fungal/bacterial (EC 1.11.1.-)	77	MALDI-MSMS <sup>c</sup>	<i>Medicago truncatula</i>	Q1T6J6	-	2,4 ± 0,1	2,1 ± 0,2



46	Hypersensitive-induced response protein	50	MALDI-MSMS	<i>Lotus japonicum</i>	Q5KSB6	3,0 ± 0,1	1,8 ± 0,1	-
51	Pathogenesis-related protein 10 (PR10.2)	203	MALDI-ToF	<i>Vitis vinifera</i>	Q9FS43	33,0 ± 0,1	8,7 ± 0,1	-3,8 ± 0,1
55	Temperature-induced lipocalin	72	MALDI-ToF	<i>Vitis vinifera</i>	Q38JC9	ND in acqua	ND in acqua e chitosano	ND in chitosano
57	Pathogenesis-related protein 10 (PR10.2)	214	MALDI-MSMS <sup>c</sup>	<i>Vitis vinifera</i>	Q9FS43	14,3 ± 0,1	ND in chitosano	ND in chitosano
58	Pathogenesis-related protein 10 (PR10.2)	50	MALDI-MSMS <sup>c</sup>	<i>Vitis vinifera</i>	Q9FS43	ND in acqua	ND in acqua	-
<b>Trascrizione del DNA, processamento di mRNA e proteine</b>								
8	Putative threonyl-tRNA synthetase	104	MALDI-MSMS	<i>Oryza sativa subsp. japonica</i>	Q6Z0N5	ND in acqua	ND in acqua	3,4 ± 0,1
39	60S acidic ribosomal protein P0	48	MALDI-MSMS	<i>Vitis vinifera</i>	A5AXI6	-3,0 ± 0,1	1,9 ± 0,1	5,6 ± 0,1
40	60S acidic ribosomal protein P0	201	MALDI-MSMS <sup>c</sup>	<i>Vitis vinifera</i>	A5AXI6	-2,2 ± 0,1	-	-
41	60S acidic ribosomal protein P0	66	MALDI-MSMS	<i>Vitis vinifera</i>	A5AXI6	-3,5 ± 0,1	-2,0 ± 0,1	-
59	Glycine rich RNA binding protein	37	MALDI-MSMS	<i>Oryza sativa</i>	Q8VXC4	15,2 ± 0,1	14,2 ± 0,1	-
<b>Metabolismo energetico</b>								
9	Vacuolar ATP synthase catalytic subunit A (EC 3.6.3.14)	123	MALDI-ToF	<i>Daucus carota</i>	P09469	7,3 ± 0,1	2,0 ± 0,1	-3,4 ± 0,1
18	6-phosphogluconate dehydrogenase (EC 1.1.1.44)	226	MALDI-ToF	<i>Vitis vinifera</i>	A5B7A4	ND in acqua e ac.acetico	ND in acqua	ND in ac.acetico

22	Phosphoglycerate kinase (EC 2.7.2.3)	110	MALDI-ToF	<i>Vitis vinifera</i>	A5CAF8	-	-	2,5 ± 0,1
33	Fructose-1,6-bisphosphatase, cytosolic (EC 3.1.3.11)	77	MALDI-MSMS	<i>Oryza sativa subsp. japonica</i>	Q0JHF8	-2,7 ± 0,2	1,9 ± 0,2	5,2 ± 0,2
37	Mixture: Fructose-bisphosphate aldolase (EC 4.1.2.13) + Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (EC 1.2.1.12)	238	MALDI-ToF	<i>Vitis vinifera</i> + <i>Capsicum annuum</i>	A5B118 + Q8VWP1	ND in acqua	ND in acqua	-
54	Putative quinone reductase (Fragment)	208	MALDI-MSMS	<i>Vitis vinifera</i>	Q6YCG4	2,8 ± 0,1	2,4 ± 0,1	-

#### Proteine di canali transmembrana o associate ad essi

2	Plasma membrane-associated AAA-ATPase.	233	MALDI-ToF	<i>Glycine max</i>	Q2HZ34	ND in acqua e ac.acetico	ND in acqua	ND in ac.acetico
28	Putative vacuolar ATP synthase subunit C (EC 3.6.3.14)	55	MALDI-MSMS	<i>Oryza sativa subsp. japonica</i>	Q6L4R5	2,4 ± 0,1	-	-3,8 ± 0,1
45	Putative $\beta$ -subunit of K <sup>+</sup> channels	81	MALDI-MSMS	<i>Solanum tuberosum</i>	O82064	1,9 ± 0,1	12,7 ± 0,1	6,7 ± 0,1
48	34 kDa outer mitochondrial membrane protein porin-like protein	45	MALDI-MSMS	<i>Solanum tuberosum</i>	Q2PYX4	4,6 ± 0,1	-	-2,5 ± 0,1
49	34 kDa outer mitochondrial membrane protein porin-like protein	128	MALDI-MSMS	<i>Solanum tuberosum</i>	Q2PYX4	-	-	-1,9 ± 0,1

#### Metabolismo degli amminoacidi

17	Serine hydroxymethyltransferase (EC 2.1.2.1)	137	MALDI-MSMS <sup>c</sup>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	O23254	ND in ac.acetico	-2,1 ± 0,2	ND in ac.acetico
21	Chorismate synthase (EC 4.2.3.5)	218	MALDI-ToF <sup>c</sup>	<i>Vitis vinifera</i>	A5APN1	ND in ac.acetico	-	ND in ac.acetico

<b>34</b>	Cysteine synthase (EC 2.5.1.47)	174	MALDI-MSMS <sup>c</sup>	<i>Vitis vinifera</i>	A5AFH5	ND in acqua	ND in acqua e chitosano	ND in chitosano
<b>Altre proteine</b>								
<b>3</b>	Phospholipase D $\alpha$ (EC 3.1.4.4)	88	MALDI-ToF <sup>c</sup>	<i>Vitis vinifera</i>	Q09VU3	ND in acqua	ND in acqua	-5,2 $\pm$ 0,1
<b>11</b>	Putative beta-D-xylosidase (EC 3.2.1.-) (Fragment)	107	MALDI-MSMS	<i>Prunus persica</i>	P83344	ND in acqua	ND in acqua	-2,7 $\pm$ 0,1
<b>12</b>	Putative beta-D-xylosidase (EC 3.2.1.-) (Fragment)	101	MALDI-MSMS	<i>Prunus persica</i>	P83344	ND in acqua	ND in acqua e chitosano	ND in chitosano
<b>13</b>	Putative beta-D-xylosidase (EC 3.2.1.-) (Fragment)	113	MALDI-MSMS	<i>Prunus persica</i>	P83344	ND in acqua	ND in acqua	-3,0 $\pm$ 0,1
<b>20</b>	ATP sulfurylase (EC 2.7.7.4)	45	MALDI-MSMS	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Q9SE02	ND in ac.acetico	-	ND in ac.acetico
<b>42</b>	Beta 1-3 glucanase (EC 3.2.1.6)	116	MALDI-MSMS	<i>Vitis vinifera</i>	Q9M3U4	-	1,9 $\pm$ 0,2	2,3 $\pm$ 0,3
<b>44</b>	Beta 1-3 glucanase (EC 3.2.1.6)	113	MALDI-MSMS	<i>Vitis vinifera</i>	Q9M3U4	3,6 $\pm$ 0,1	13,7 $\pm$ 0,1	3,8 $\pm$ 0,1
<b>52</b>	Fruit-ripening protein-like	142	MALDI-MSMS <sup>c</sup>	<i>Solanum tuberosum</i>	Q2XTC9	4,7 $\pm$ 0,2	4,2 $\pm$ 0,2	-
<b>Proteine con funzione sconosciuta</b>								
<b>1</b>	Putative uncharacterized protein	152	MALDI-MSMS <sup>c</sup>	<i>Vitis vinifera</i>	A5ASS1	16,9 $\pm$ 0,4	ND in chitosano	ND in chitosano
<b>4</b>	Putative uncharacterized protein	282	MALDI-ToF	<i>Vitis vinifera</i>	A5AHA8	-	-	2,2 $\pm$ 0,1
<b>5</b>	Putative uncharacterized protein	88	MALDI-ToF	<i>Vitis vinifera</i>	A5C7K7	ND in ac.acetico	-	ND in ac.acetico

<b>6</b>	Putative uncharacterized protein	113	MALDI-ToF <sup>c</sup>	<i>Vitis vinifera</i>	A5C7K7	-2,3 ± 0,1	-	3,4 ± 0,2
<b>7</b>	Putative uncharacterized protein	212	MALDI-ToF <sup>c</sup>	<i>Vitis vinifera</i>	A5C7K7	ND in acqua e ac.acetico	ND in acqua	ND in ac.acetico
<b>10</b>	Putative uncharacterized protein	176	MALDI-MSMS <sup>c</sup>	<i>Vitis vinifera</i>	A5BR81	ND in ac.acetico	-	ND in ac.acetico
<b>19</b>	Putative uncharacterized protein	90	MALDI-ToF	<i>Vitis vinifera</i>	A5BX54	ND in acqua e ac.acetico	ND in acqua	ND in ac.acetico
<b>27</b>	Putative uncharacterized protein	84	MALDI-ToF	<i>Vitis vinifera</i>	A5BTX7	-	4,2 ± 0,1	3,8 ± 0,1
<b>29</b>	Putative uncharacterized protein	161	MALDI-ToF	<i>Vitis vinifera</i>	A5B1L7	5,0 ± 0,1	1,9 ± 0,1	-2,6 ± 0,1
<b>30</b>	Putative uncharacterized protein	71	MALDI-ToF	<i>Vitis vinifera</i>	A5AP38	-	-	2,2 ± 0,1
<b>31</b>	Putative uncharacterized protein	145	MALDI-ToF	<i>Vitis vinifera</i>	A5BUU4	ND in acqua	ND in acqua	4,1 ± 0,1
<b>32</b>	Putative uncharacterized protein	171	MALDI-MSMS <sup>c</sup>	<i>Vitis vinifera</i>	A5BHU1	-2,9 ± 0,1	-	3,1 ± 0,1
<b>35</b>	Putative uncharacterized protein	59	MALDI-MSMS	<i>Vitis vinifera</i>	A5B7S5	3,1 ± 0,1	2,3 ± 0,1	-
<b>38</b>	Putative uncharacterized protein	142	MALDI-ToF <sup>c</sup>	<i>Vitis vinifera</i>	A5B3A6	ND in ac.acetico	-	ND in ac.acetico
<b>43</b>	Putative uncharacterized protein	114	MALDI-ToF	<i>Vitis vinifera</i>	A5APX1	ND in ac.acetico	-	ND in ac.acetico
<b>47</b>	Putative uncharacterized protein	41	MALDI-MSMS	<i>Oryza sativa subsp. japonica</i>	Q8S5S0	13,1 ± 0,1	10,8 ± 0,1	-
<b>50</b>	Putative uncharacterized protein	111	MALDI-MSMS	<i>Vitis vinifera</i>	A5AG33	4,4 ± 0,1	-	-3,7 ± 0,1

<b>53</b>	Putative uncharacterized protein	108	MALDI-MSMS <sup>c</sup>	<i>Vitis vinifera</i>	A5BPW8	-	2,2 ± 0,1	2,3 ± 0,1
<b>56</b>	Putative uncharacterized protein	112	MALDI-MSMS	<i>Vitis vinifera</i>	A5BPW8	ND in acqua	ND in acqua	-

<sup>a</sup>, Il Mowse scores è significativo quando è maggiore delle seguenti soglie: MALDI-ToF >69; MALDI-MSMS >36.

<sup>b</sup>, la variazione rappresenta la media ± SD di due differenti gel per i due controlli ed il trattamento.

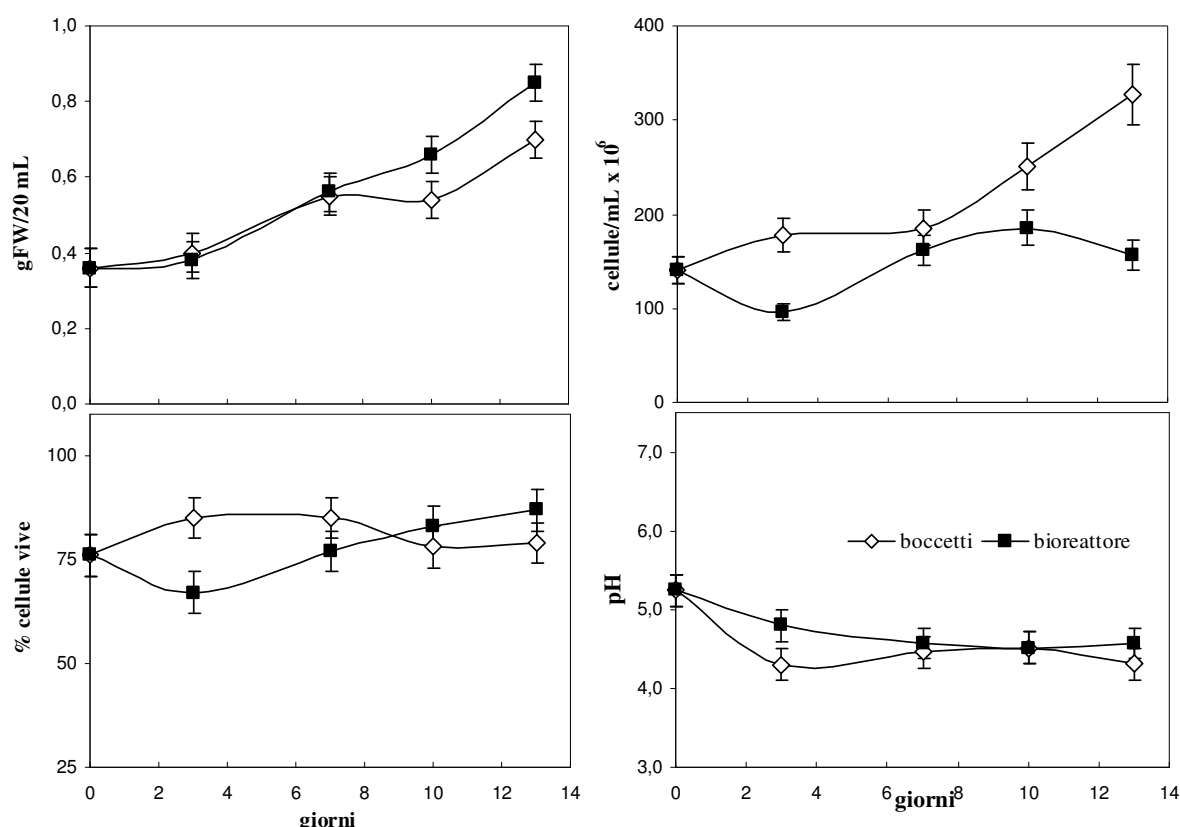
<sup>c</sup>, risultato confermato da due o più tecniche. In Tabella 3 è riportata la tecnica con il Mowse score relativo maggiore.

FC, (fold change) variazione della quantità di proteina; ND, non determinabile; (-), variazione -2<FC<+2.

## 6. COLTURE IN BIOREATTORE

### 6.1 Boccetti e fermentazione 1: passaggio di scala

Al fine di valutare gli effetti del passaggio di scala, una prima fermentazione di prova F1 è stata eseguita in parallelo ad una time-course in boccetti. Per l'inoculo di entrambe è stata utilizzata la medesima coltura (0,36 gFW/20 mL) ed il terreno utilizzato conteneva rifampicina alla concentrazione finale di 25 µg/mL (per prevenire inquinamenti batterici, ma anche perchè ne sono stati osservati gli effetti stimolatori sul resveratrolo). Si è cercato di mantenere le condizioni di coltura il più simili possibile nei due sistemi: stessa temperatura (24°C), stesso rapporto fra inoculo e terreno fresco (1:1), ecc. Sicuramente differenti sono stati i volumi di coltura (20 mL nei boccetti, 800 mL in F1), l'agitazione (su agitatore orbitale per i boccetti, con 2 eliche a turbina a 70 rpm in F1) e l'aerazione (assente nei boccetti, con aria insufflata a 0,4 L/min in F1).



**Figura 26.** Parametri di crescita delle colture di cellule di Barbera (*Vitis vinifera*) cresciute in boccetti da 20 mL ed in bioreattore da 1 L. I dati sono la media di 3 campioni (repliche biologiche)  $\pm$  SD. (a) peso fresco espresso in g/20 mL; (b) conta cellulare espressa in numero di cellule/mL; (c) vitalità espressa come percentuale di cellule vive; (d) pH del terreno.

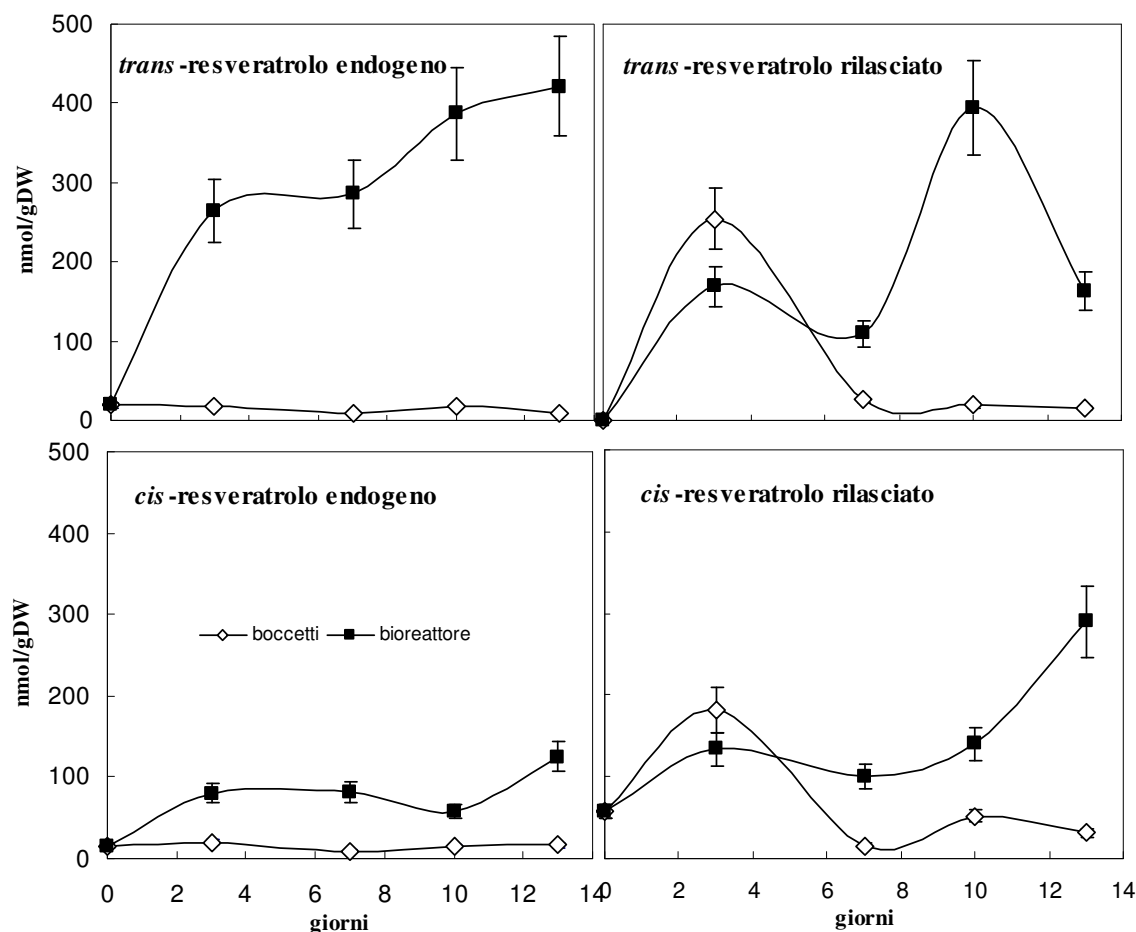
Le colture nei boccetti ed in F1 hanno mostrato un andamento analogo dei parametri di crescita. Numero di cellule/mL e peso fresco hanno dimostrato una crescita rapida delle

colture in entrambi i sistemi (Figure 26a e 26b). La vitalità delle cellule si è mantenuta superiore al 75 % in entrambe le condizioni di coltura (Figura 26c) ed anche il pH del terreno ha mostrato lo stesso andamento (Figura 26d).

Nel bioreattore le cellule tendono a formare numerosi e grossi aggregati in cui non è possibile stimare esattamente il numero di cellule, quindi l'apparente incongruenza fra il maggior numero di cellule nei bocchetti ed il maggior peso fresco nei fermentatore (Figure 26a e 26b) potrebbe essere dovuta ad una sottostima della conta in F1. Il peso fresco ed il tempo di duplicazione della biomassa (TMD) sono risultati essere maggiori in bioreattore (Figura 26a), ma c'è un importante effetto di concentrazione dovuto all'evaporazione del terreno di coltura (circa 150 mL su 800 in 14 giorni) ed un effetto di disomogeneità causato dalla agitazione inadeguata. Le eliche a turbina (adatte per colture di microorganismi), infatti, non si sono dimostrate adatte alla miscelazione della coltura, tanto che l'aliquota di coltura ottenuta aprendo il bioreattore al quattordicesimo giorno e dopo aver mescolato manualmente, ha mostrato di contenere l'11,5 % di peso fresco in più rispetto al campione prelevato normalmente al giorno 14. Questo a causa di una concentrazione delle cellule sul fondo del bioreattore e della crescita sulle pareti. Il TMD calcolato dai dati di peso fresco dei campionamenti è risultato essere di 13,5 giorni nei bocchetti e di 7,7 giorni in bioreattore (F1). Se nel bioreattore ci fossero stati i circa 150 mL evaporati e se la coltura fosse stata ben miscelata, il TMD in F1 sarebbe risultato essere di 13,5 giorni, cioè uguale a quello riscontrato nei bocchetti. Nelle successive fermentazioni si è quindi deciso di utilizzare un'elica marina che garantisce l'omogeneità della coltura.

Nei campioni di coltura raccolti sia dai bocchetti che dal bioreattore, è stato quantificato il resveratrolo tramite i "metodi 1" e HPLC-UV (Metodi paragrafi 4.1-4.5). Entrambe le forme isomeriche sono state sia accumulate che rilasciate nel terreno in misura maggiore nelle colture cresciute in bioreattore rispetto a quelle in bocchetto (Figura 27). L'effetto maggiore lo si è osservato sul *trans*-resveratrolo intracellulare che, infatti, nei bocchetti non ha mostrato un picco ed è rimasto per tutto il periodo circa costante a 10-20 nmol/gDW, mentre in F1 è stato accumulato fino a raggiungere le 450 nmol/gDW, aumentando nel tempo (Figura 27). I campioni sono stati prelevati ogni 3 giorni, quindi l'assenza del picco nella coltura in bocchetti può essere dovuta al mancato campionamento del giorno esatto, precedentemente riscontrato al giorno 4 (Figura 13). Il *trans*-resveratrolo è stato rilasciato con un picco al giorno 3 di 250 nmol/gDW nei bocchetti e 170 nmol/gDW nel bioreattore, ma in F1 si è osservato un secondo picco di 400 nmol/gDW al giorno 11 (Figura 27). Il *cis*-resveratrolo intracellulare nei bocchetti

è rimasto circa costante a 10-20 nmol/gDW, come il *trans*, mentre in F1 è 4-8 volte superiore (Figura 27). Il rilascio dell'isomero *cis* è avvenuto nei bocchetti con un picco di circa 180 nmol/gDW al giorno 3, mentre in F1 è rimasto circa costante attorno alle 100-130 nmol/gDW nei primi 10 giorni di coltura, per poi aumentare alla fine raggiungendo le 300 nmol/gDW (Figura 27).



**Figura 27.** *Trans* e *cis*-resveratrolo determinato tramite analisi HPLC-UV all'interno delle cellule e nel terreno delle colture di cellule di Barbera (*Vitis vinifera*) cresciute in bocchetti da 20 mL ed in bioreattore da 1 L. I dati sono la media di 3 campioni  $\pm$  SD.

## 6.2 Fermentazioni 2a e 3: saccarosio nel terreno

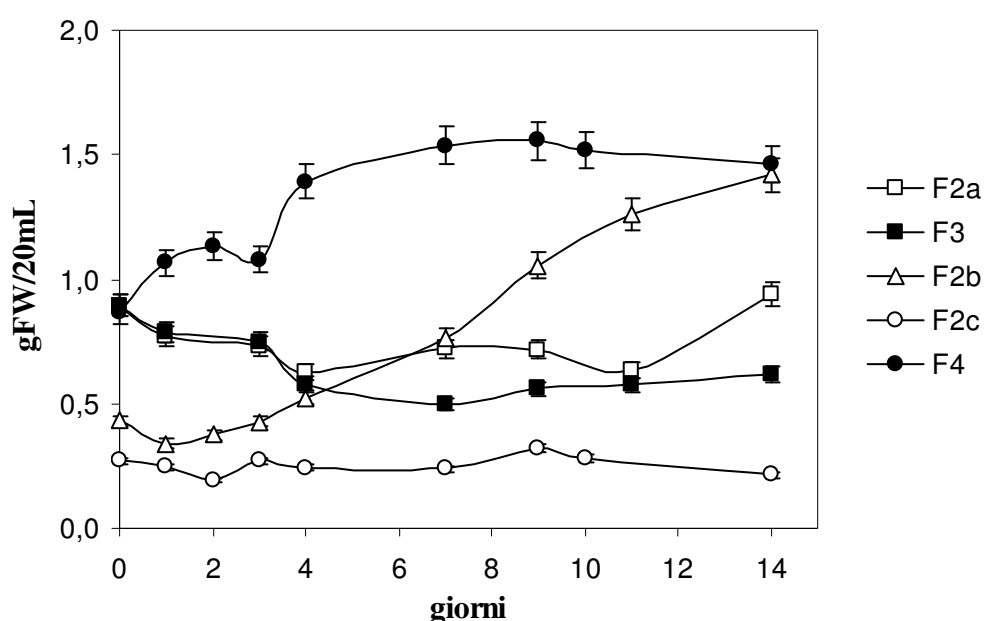
Allo scopo di ottimizzare il contenuto saccaridico del terreno, sono state eseguite due fermentazioni in parallelo con 30 g/L (F2a) e 10g/L (F3) di saccarosio. Le condizioni di coltura sono state le stesse utilizzate per F1 con l'unica variazione dell'agitazione, svolta da un'elica marina alla velocità di 100 rpm, che ha reso omogenea la coltura.

La coltura di F2a è stata alimentata al quattordicesimo giorno e mantenuta altri 14 giorni nelle stesse condizioni di crescita per valutare l'influenza del tempo di permanenza in bioreattore (F2b) (paragrafo 6.3). Al termine delle due settimane è stata nuovamente alimentata ed è stata



trattata con chitosano 50  $\mu\text{g/mL}$  (F2c), mentre parallelamente è stata iniziata la fermentazione F4 nelle condizioni di F3 con l'aggiunta di chitosano (paragrafo 6.4).

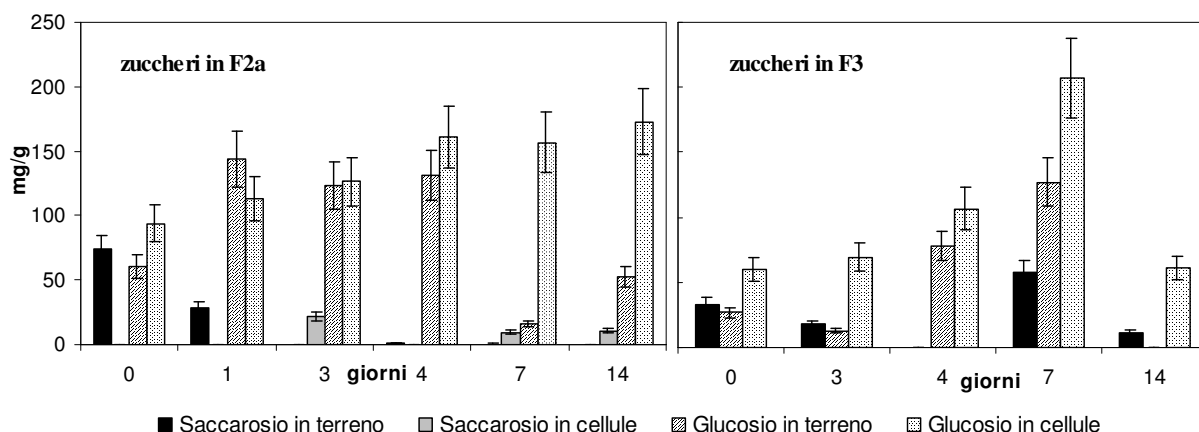
L'inoculo iniziale di F2a e F3 è stato di circa 0,9 gFW/20 mL ed il peso fresco è diminuito nei primi giorni per cominciare lentamente a crescere solo nella seconda settimana di fermentazione, per ritornare al valore dell'inoculo (Figura 28). La vitalità si è mantenuta sempre superiore all'80 %, il numero di cellule ha mostrato un andamento coerente con quello del peso fresco ed il pH ha seguito lo stesso andamento del controllo in boccetti rappresentato in Figure 13 e 26 (dati non mostrati).



**Figura 28.** Peso fresco, espresso in g/20 mL, nelle colture di cellule di Barbera (*Vitis vinifera*) cresciute in bioreattore nelle condizioni definite per F2a, F3, F2b, F2c, F4. I dati sono la media di 3 campioni  $\pm$  SD.

Il contenuto di zuccheri (saccarosio e glucosio) è stato misurato in cellule e terreni.

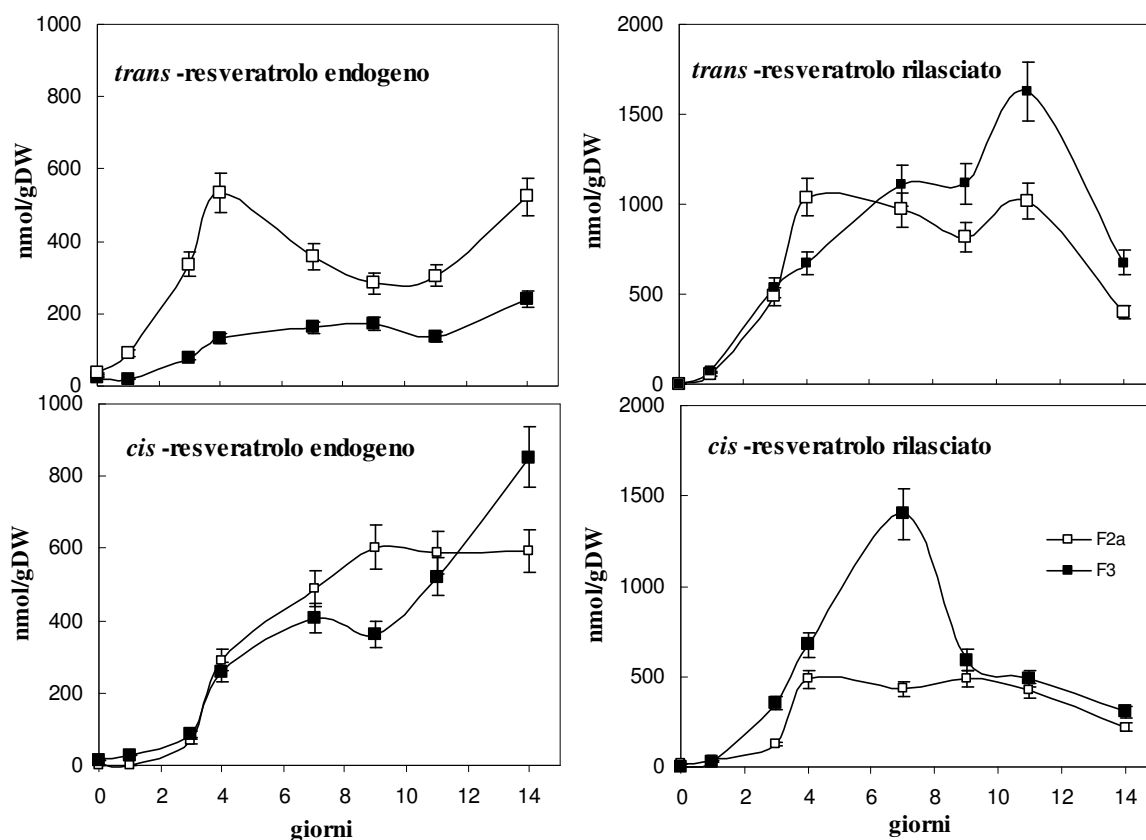
Come prevedibile, in entrambe le fermentazioni F2a e F3 al giorno 0 il saccarosio era presente solo nel terreno, mentre il glucosio era anche ed in quantità maggiore all'interno delle cellule. Col passare dei giorni si è osservato che il saccarosio veniva progressivamente assorbito dal terreno e metabolizzato in glucosio. Il glucosio, quindi, cresceva e poi scompariva nel terreno ed aumentava nelle cellule (Figura 29).



**Figura 29.** Saccarosio e glucosio in terreno e cellule nelle colture di Barbera (*Vitis vinifera*) in bioreattore alimentate con 30 g/L (F2a) e 10 g/L (F3) di saccarosio al giorno 0. I dati sono la media di 3 campioni  $\pm$  SD.

Per analizzare la produzione di polifenoli nelle fermentazioni F2a e F3, e per le successive, sono stati utilizzati i “metodi 2” e HPLC-DAD (Metodi paragrafi 4.6-4.10), allargando col passare del tempo la gamma dei composti quantificati.

La produzione di stilbeni nelle due fermentazioni in questione è stata paragonabile, con i livelli di vari composti nello stesso ordine di grandezza.

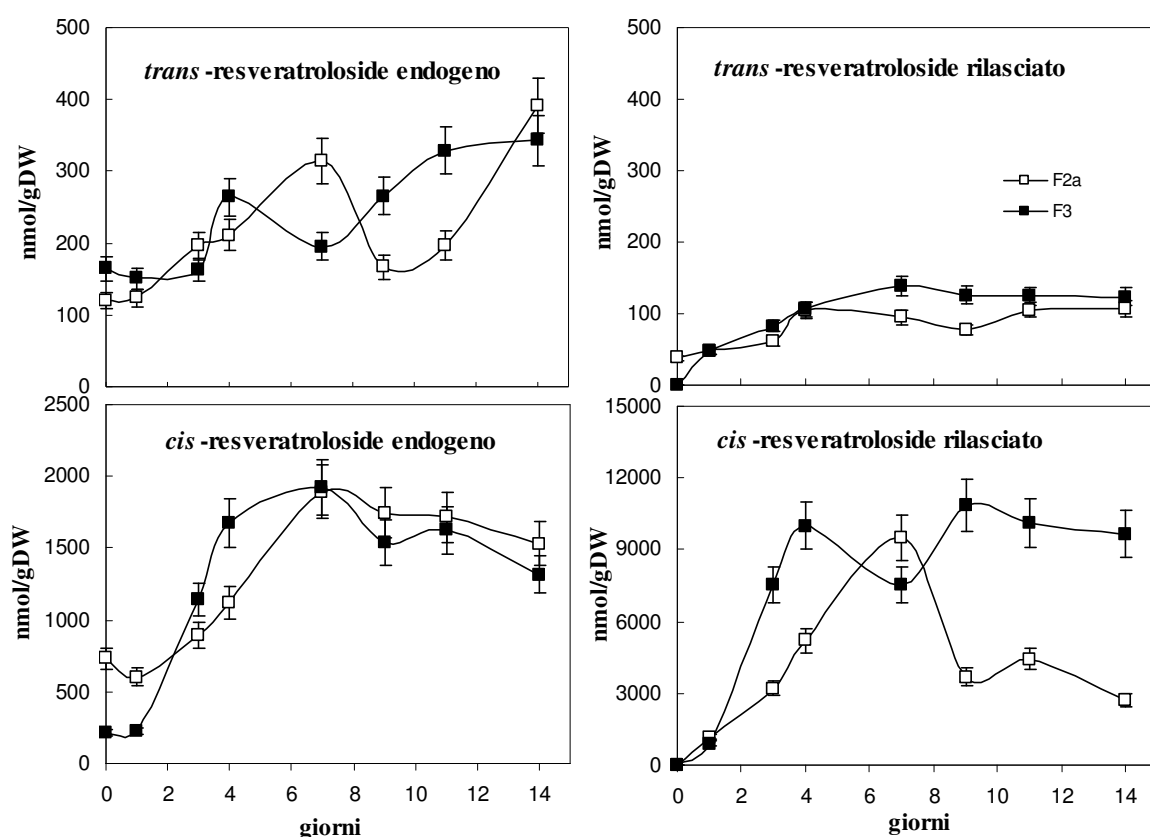


**Figura 30.** *Trans* e *cis*-resveratrolo determinato tramite analisi HPLC-DAD all'interno delle cellule e nel terreno delle colture di cellule di Barbera (*Vitis vinifera*) delle fermentazioni F2a e F3. I dati sono la media di 3 campioni  $\pm$  SD.

Il *trans*-resveratrolo in F2a è stato più rilasciato nel terreno che accumulato all'interno delle cellule, mentre la forma *cis* è stata più o meno equamente ripartita (Figura 30). Le quantità endogene e secreta sommate sono all'incirca uguali per i 2 isomeri. In F3 le differenze fra i due isomeri sono state minori e la quantità rilasciata nel terreno è stata maggiore, soprattutto per quel che riguarda il *cis*-resveratrolo con un picco al giorno 7 (Figura 30).

Il piceide si è rivelato molto scarso in entrambe le fermentazioni ed in particolare la forma *cis* era completamente assente (dati non mostrati).

Molto più rilevante è stata la presenza del resveratroloside, soprattutto in forma *cis*, in entrambe le fermentazioni. L'isomero *trans*, infatti, era presente in quantità inferiori alle 400 nmol/gDW, mentre il *cis*-resveratroloside è stato misurato nell'ordine di grandezza delle migliaia di nmol/gDW, sia endogeno che rilasciato nel terreno (Figura 31).



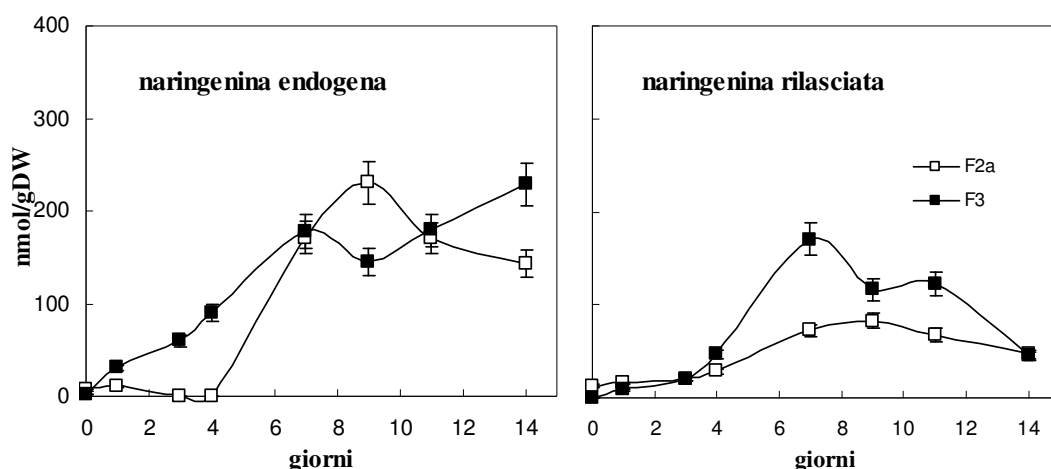
**Figura 31.** *Trans* e *cis*-resveratroloside determinato tramite analisi HPLC-DAD all'interno delle cellule e nel terreno delle colture di cellule di Barbera (*Vitis vinifera*) delle fermentazioni F2a e F3. I dati sono la media di 3 campioni  $\pm$  SD.

I flavonoidi erano presenti in quantità inferiori agli stilbeni.

La naringenina è stata prodotta e rilasciata maggiormente in F3 per tutto il periodo di osservazione, con l'eccezione del giorno 9, in cui in F2a si è osservato un picco

nell'accumulo endogeno. Durante la seconda settimana di coltura, la quantità intracellulare è risultata essere maggiore di quella nel terreno (Figura 32).

Rutina e quercetina sono assenti o presenti in tracce.



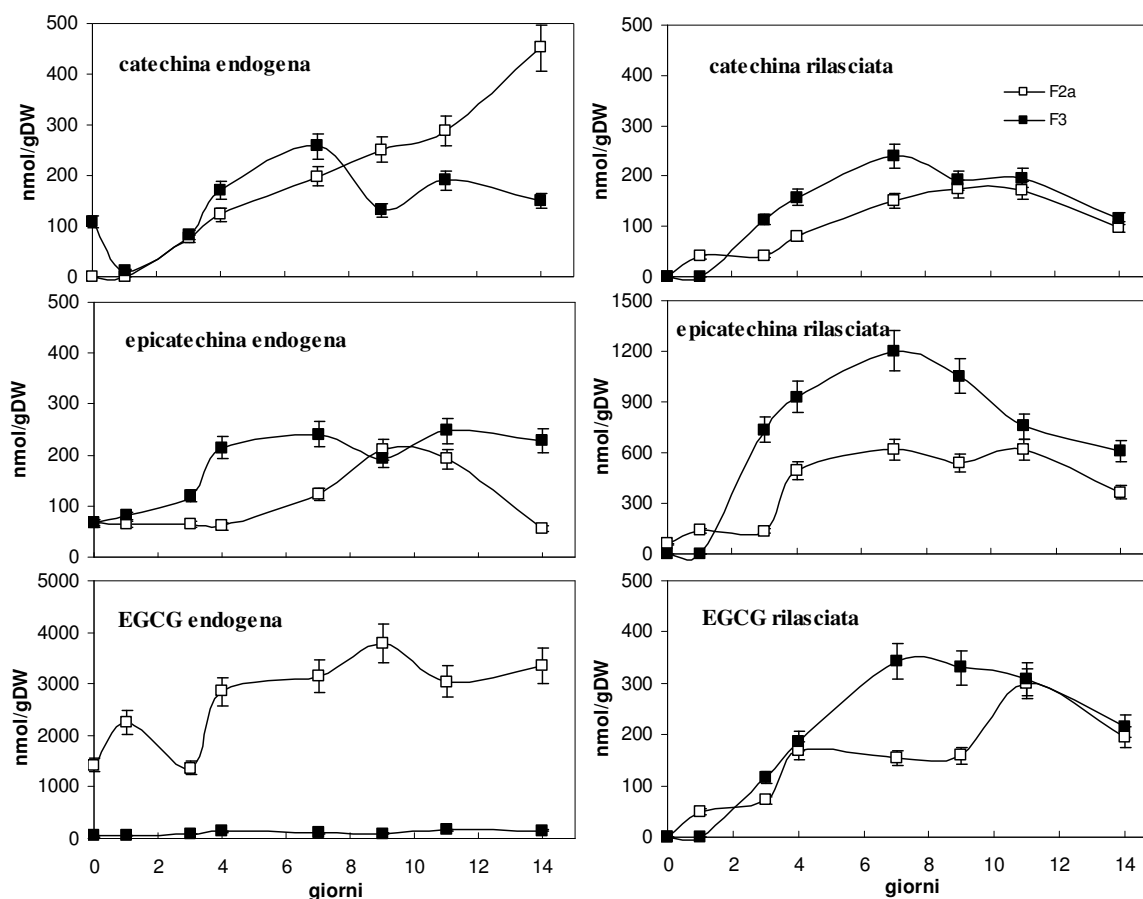
**Figura 32.** Naringenina determinata tramite analisi HPLC-DAD all'interno delle cellule e nel terreno delle colture di cellule di Barbera (*Vitis vinifera*) delle fermentazioni F2a e F3. I dati sono la media di 3 campioni  $\pm$  SD.

I livelli delle catechine hanno evidenziato differenze significative fra le due fermentazioni, cioè in condizioni di coltura con diversa disponibilità di zucchero.

La catechina rilasciata nel terreno ha avuto un andamento analogo in F2a e F3, ma con valori superiori in F3, mentre quella presente all'interno delle cellule è cresciuta linearmente in entrambe le fermentazioni nella prima settimana di coltura, ma durante la seconda settimana è diminuita in F3 e ha continuato a crescere in F2a (Figura 33).

L'epicatechina è stata rilasciata nel terreno in quantità maggiori di quelle accumulate nelle cellule. I livelli endogeni e rilasciati sono stati maggiori in F3 rispetto a F2a e, in particolare, in F3 si è osservato un rilascio che nei giorni centrali della fermentazione è stato circa doppio rispetto a F2a (Figura 33).

L'EGCG è il flavonoide che è variato di più fra le due fermentazioni che differiscono per il contenuto di saccarosio nel terreno. In F2a l'EGCG è stata rilasciata in quantità crescenti ma inferiori alle 300 nmol/gDW, mentre all'interno delle cellule ha raggiunto dopo pochi giorni e poi mantenuto un livello compreso fra le 3000 e le 4000 nmol/gDW. In F3 la quantità intracellulare è rimasta inferiore alle 150 nmol/gDW per tutta la durata della fermentazione, ed il rilascio ha mostrato un massimo di 350 nmol/gDW al giorno 7 e per poi decrescere (Figura 33).



**Figura 33.** Catechina, epicatechina ed epigallo catechina gallata (EGCG) determinate tramite analisi HPLC-DAD all'interno delle cellule e nel terreno delle colture di cellule di Barbera (*Vitis vinifera*) delle fermentazioni F2a e F3. I dati sono la media di 3 campioni  $\pm$  SD.

L'acido cinnamico è risultato assente in F2a, mentre in F3 ha mostrato quantità altalenanti sia nelle cellule che nel terreno. L'acido caffeico e l'acido clorogenico sono stati sempre presenti in tracce.

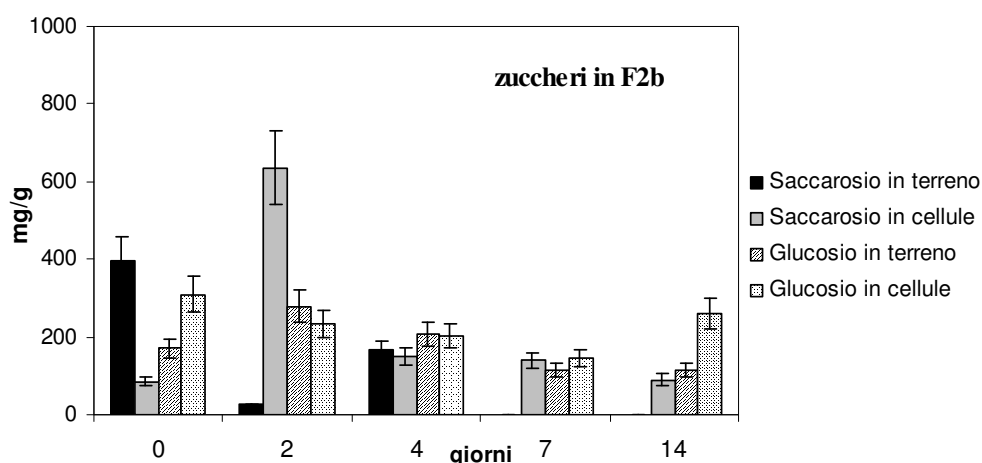
L'acido gallico si è rivelato assente nei terreni e rilevabile in minime tracce all'interno delle cellule.

Piceatannolo, calcone, kaemferolo, epicatechina gallata, epigallo catechina, acido *p*-cumarico, acido *trans*-ferulico e acido sinapico non sono stati quantificati in quanto la metodica separativa è stata messa a punto successivamente.

### 6.3 Fermentazioni 2a e 2b: tempo di permanenza in bioreattore

Al termine della fermentazione F2a è stato aggiunto terreno fresco dando così inizio alla fermentazione F2b. Quindi l'inoculo di F2b è la coltura di F2a diluita circa del 50 % (circa 0,40 gFW/20 mL al giorno 0). Lo stesso è stato fatto con F3, ma dopo pochi giorni la coltura è risultata inquinata, per cui è stata interrotta.

Come si può osservare in Figura 28, il peso fresco della coltura F2b ha avuto un piccolo calo nelle prime 24 ore e poi, diversamente da F2a, ha cominciato a crescere molto rapidamente, tanto che il TMD calcolato è di 8,7 giorni. Il numero di cellule ha seguito lo stesso andamento del peso fresco, mentre vitalità e pH sono stati analoghi a quelli di F2a (dati non mostrati). Entrambe le fermentazioni sono state alimentate con terreno contenente 30 g/L di saccarosio e le analisi degli zuccheri hanno mostrato un consumo di saccarosio e glucosio analogo. Il saccarosio è passato dal terreno all'interno delle cellule, mentre il glucosio è aumentato nei primi giorni e poi è stato metabolizzato (Figure 29 e 34).

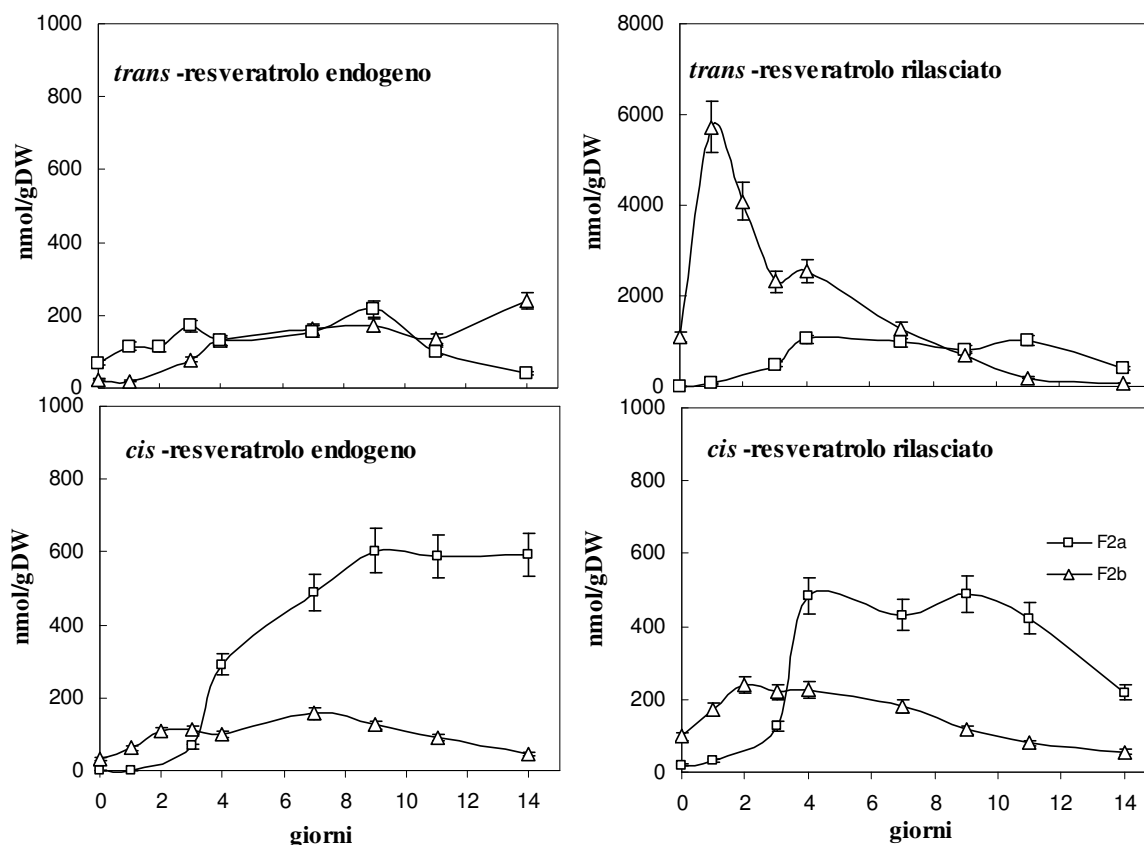


**Figura 34.** Saccarosio e glucosio in terreno e cellule nella coltura di Barbera (*Vitis vinifera*) in bioreattore alimentata per la seconda volta con terreno contenente 30 g/L (F2b) di saccarosio al giorno 0. I dati sono la media di 3 campioni  $\pm$  SD.

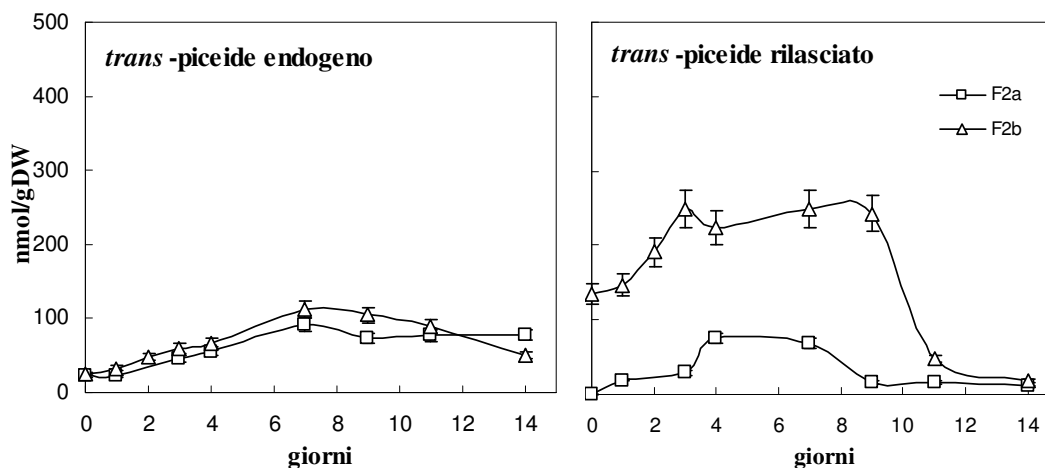
Confrontando andamenti e livelli endogeni del resveratrolo in F2a e F2b, si nota come l'isomero *trans* sia presente a livelli analoghi, mentre, nella seconda fermentazione, la forma *cis* sia rimasta circa costante attorno alle 100 nmol/gDW quando in F2a cresceva fino alle 600 nmol/gDW. In F2b l'isomero *trans* è stato fortemente rilasciato nel terreno durante la prima settimana di coltura, con un picco di quasi 6000 nmol/gDW, mentre in F2a non ha raggiunto le 1000 nmol/gFW. Il rilascio del *cis*-resveratrolo è rimasto inferiore alle 500 nmol/gDW in F2a e delle 200 nmol/gDW in F2b (Figura 35).

Anche i monoglucosidi del resveratrolo sono stati prodotti diversamente in F2b e F2a.

Il *trans*-piceide è stato rilasciato in F2b circa 2-3 volte più che in F2a, mentre è stato accumulato nelle cellule circa allo stesso livello (Figura 36). Il *cis*-piceide è assente in entrambe le fermentazioni.



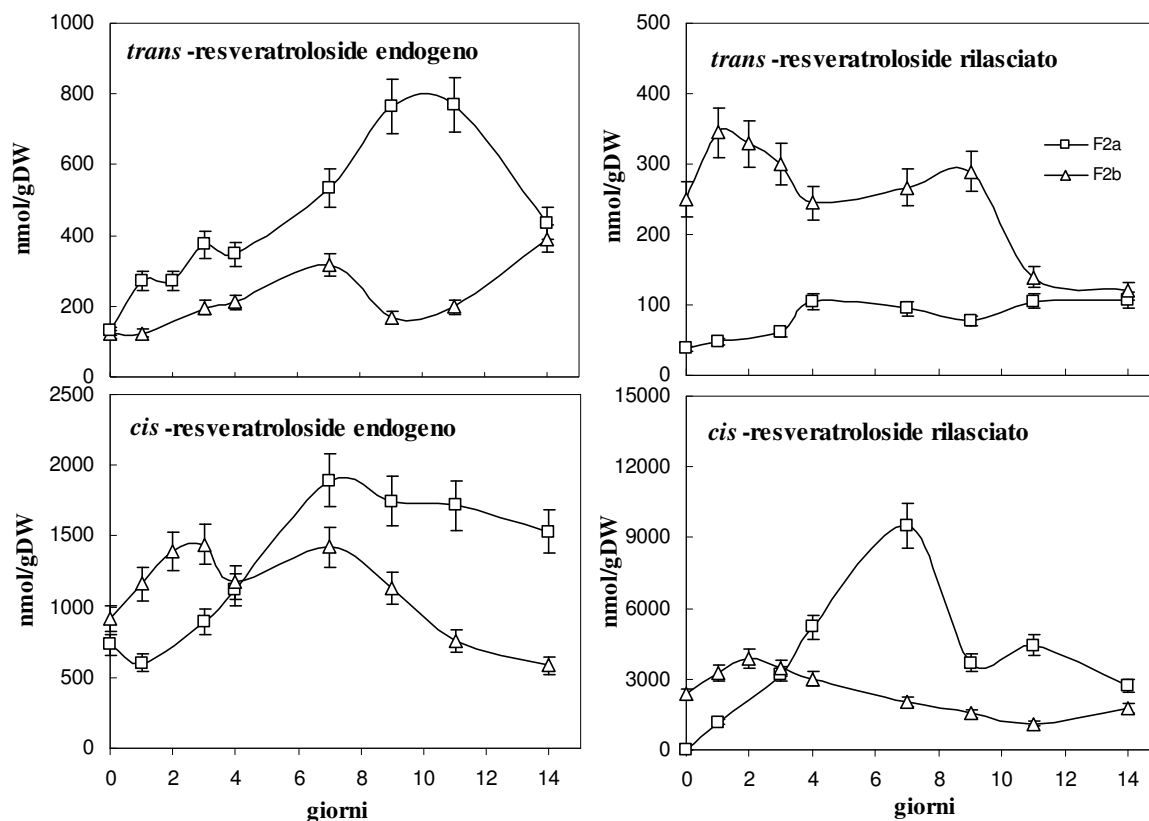
**Figura 35.** *Trans* e *cis*-resveratrolo determinato tramite analisi HPLC-DAD all'interno delle cellule e nel terreno delle colture di cellule di Barbera (*Vitis vinifera*) delle fermentazioni F2a e F2b. I dati sono la media di 3 campioni  $\pm$  SD.



**Figura 36.** *Trans*-piceide determinato tramite analisi HPLC-DAD all'interno delle cellule e nel terreno delle colture di cellule di Barbera (*Vitis vinifera*) delle fermentazioni F2a e F2b. Il *cis*-piceide è assente o presente in tracce. I dati sono la media di 3 campioni  $\pm$  SD.

Il resveratroloside intracellulare è stato misurato in livelli maggiori in F2b rispetto a F2a per quel che riguarda la forma *trans* e la *cis* nella prima settimana di coltura, e viceversa per la *cis* nei primi giorni (Figura 37). Le quantità misurate nel terreno differiscono maggiormente: il *cis*-resveratroloside in F2a ha superato le 9000 nmol/gDW, mentre in F2b è circa la metà;

anche il giorno di massimo è stato differente. Il *trans*-resveratroloside è stato rilasciato in entrambe le fermentazioni circa allo stesso livello, ma mediamente 10 volte meno del *cis*.



**Figura 37.** *Trans*- e *cis*-resveratroloside determinati tramite analisi HPLC-DAD all'interno delle cellule e nel terreno delle colture di cellule di Barbera (*Vitis vinifera*) delle fermentazioni F2a e F2b. I dati sono la media di 3 campioni  $\pm$  SD.

I flavonoidi, analogamente agli stilbeni, hanno subito l'effetto del tempo di permanenza in bioreattore, mostrando andamenti e livelli differenti fra F2a e F2b.

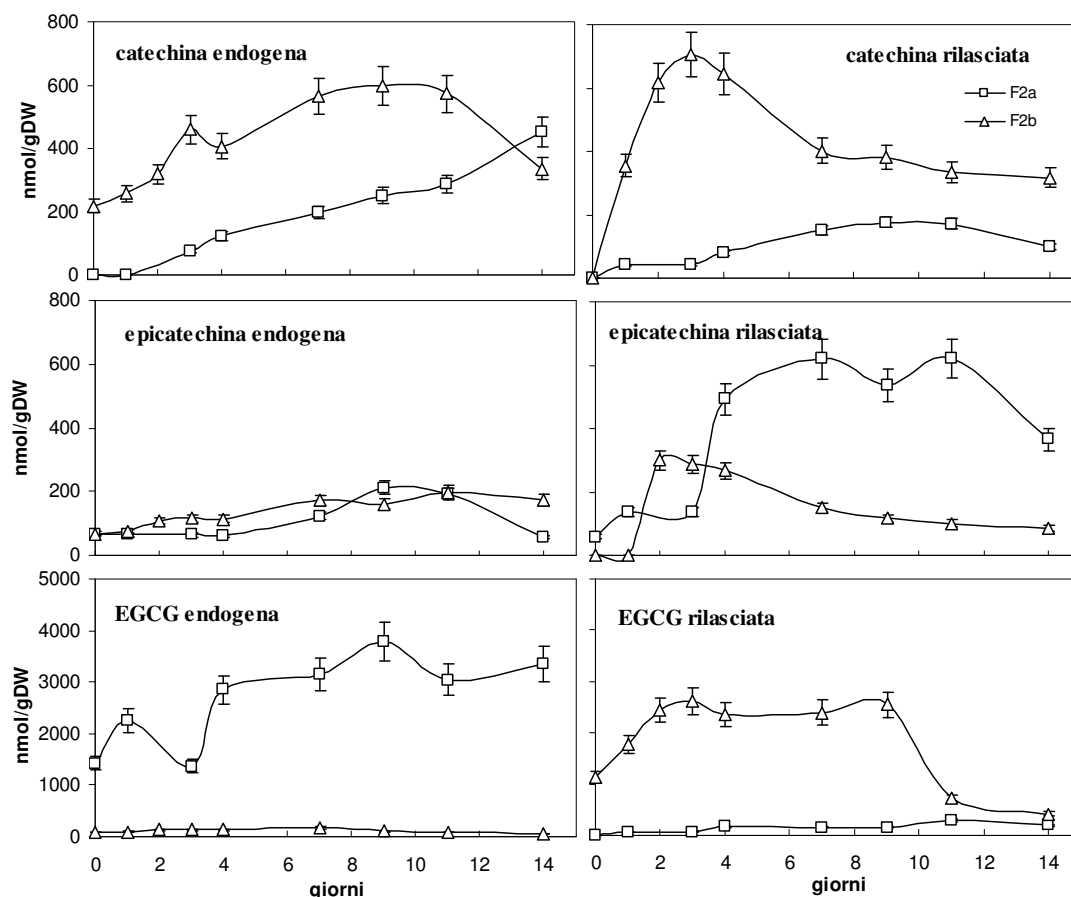
La naringenina, che in F2a era presente a bassi livelli, in F2b era in tracce in entrambe le fermentazioni, cos' come rutina e quercetina (dati non mostrati).

La catechina è stata prodotta e rilasciata maggiormente in F2b rispetto a F2a. In particolare si è osservato prevalere il rilascio nella prima settimana di coltura e l'accumulo intracellulare nella seconda (Figura 38).

L'epicatechina ha mostrato, invece, andamento opposto, essendo stata rilevata in F2b a livelli inferiori rispetto ad F2a. Anche in questo caso in F2b ha prevalso il rilascio durante la prima settimana di fermentazione e l'accumulo durante la seconda, mentre in F2a l'epicatechina è stata maggiormente secreta (Figura 38).

L'EGCG sembra essere stata sintetizzata all'incirca nella stessa quantità in F2a e F2b, ma nel primo caso è stata quasi tutta accumulata all'interno delle cellule, mentre nel secondo è stata quasi completamente rilasciata (Figura 38).





**Figura 38.** Catechina, epicatechina ed epigallo catechina gallata (EGCG) determinate tramite analisi HPLC-DAD all'interno delle cellule e nel terreno delle colture di cellule di Barbera (*Vitis vinifera*) delle fermentazioni F2a e F2b. I dati sono la media di 3 campioni  $\pm$  SD.

L'acido cinnamico, che era assente in F2a, è stato quantificato nelle cellule di F2b fra i giorni 1 e 4 ma senza raggiungere un livello veramente significativo (dato non mostrato).

L'acido caffeico e l'acido clorogenico sono stati sempre presenti in tracce.

Anche dell'acido gallico sono state osservate solo delle tracce sia all'interno delle cellule che nel terreno.

Piceatannolo, calcone, kaemferolo, epicatechina gallata, epigallo catechina, acido p-cumarico, acido *trans*-ferulico e acido sinapico non sono stati quantificati in quanto la metodica separativa è stata messa a punto successivamente.

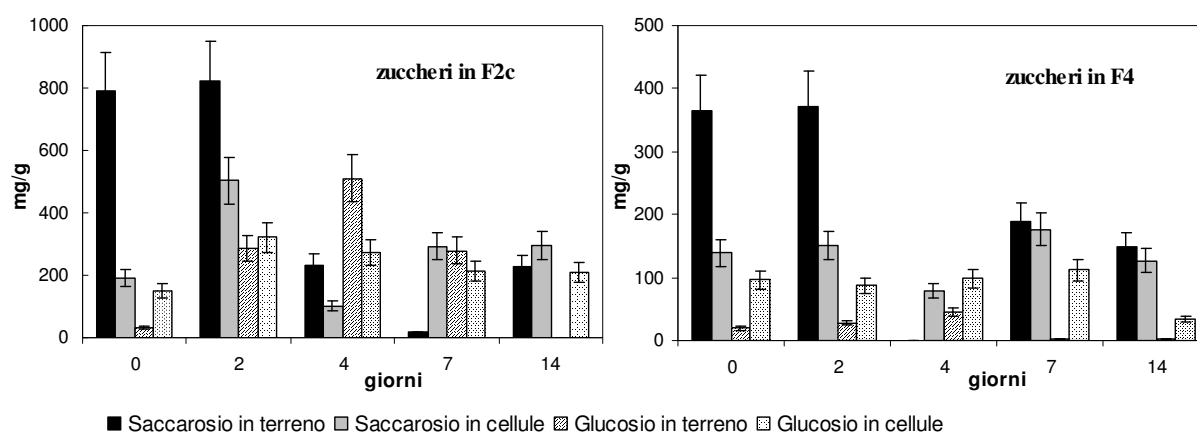
#### 6.4 Fermentazioni 2c e 4: trattamento con chitosano 50 $\mu$ g/mL e saccarosio

La fermentazione 2b al quattordicesimo giorno è stata addizionata di terreno fresco contenente saccarosio 30 g/L e chitosano alla concentrazione finale di 50  $\mu$ g/mL, dando inizio a F2c. Parallelamente è stata inoculata la fermentazione F4, anch'essa trattata con chitosano 50  $\mu$ g/mL, ma con 10 g/L di saccarosio nel terreno.

Confrontando fra loro le analisi eseguite su F2c e F4 si può valutare l'influenza della concentrazione iniziale di saccarosio nel terreno (30 e 10 g/L) in presenza di chitosano, mentre comparando queste fermentazioni rispettivamente con F2a e F3 si può osservare l'effetto dovuto al trattamento con chitosano alla concentrazione finale di 50 µg/mL.

Al giorno 0 il peso fresco era di 0,27 gFW/20 mL in F2c e 0,87 gFW/20 mL in F4. In F2c si è mantenuto all'incirca costante per le due intere settimane di coltura, mentre in F4 è cresciuto fino a circa 1,46 gFW/20 mL durante i primi giorni e poi è rimasto costante (Figura 28). Il numero di cellule ha avuto andamento analogo. La vitalità si è mantenuta costante intorno all'80 % in F2c e al 90 % in F4. Il pH ha seguito l'andamento classico delle precedenti fermentazioni (dati non mostrati).

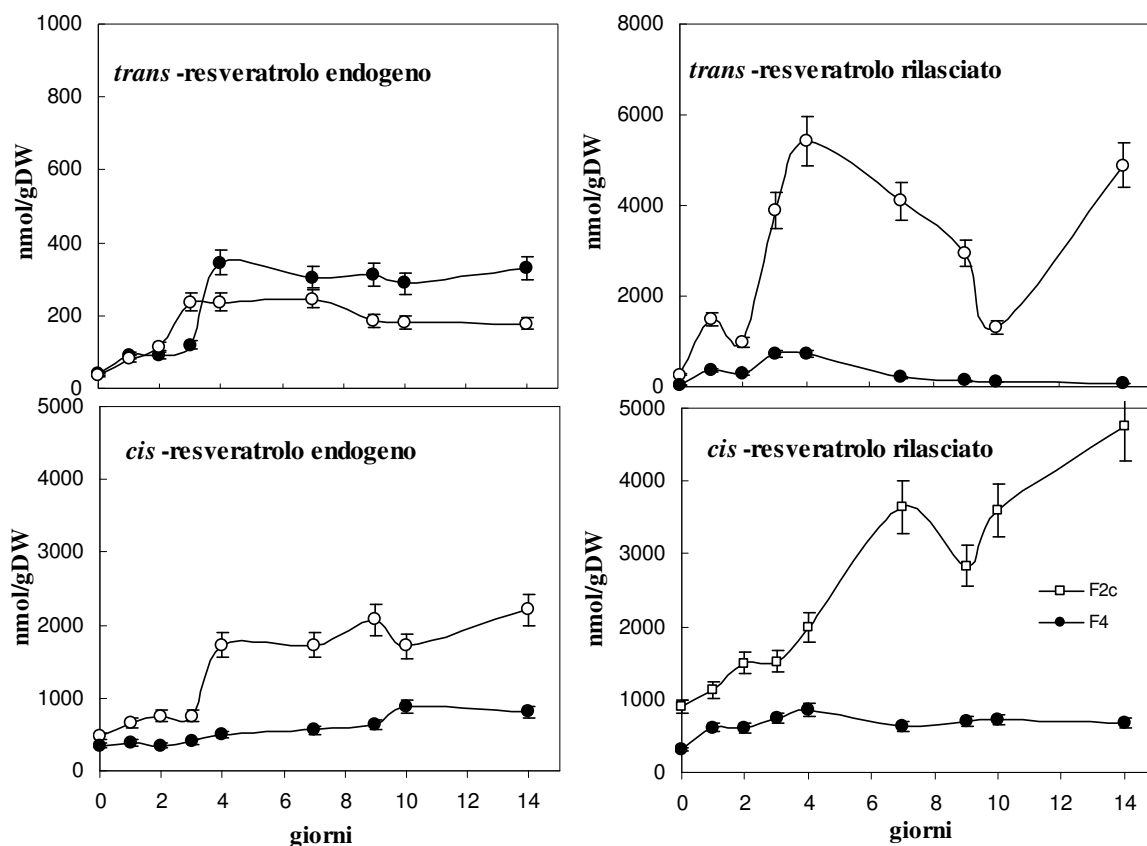
L'analisi del contenuto di saccarosio e glucosio ha evidenziato come in queste colture F2c e F4, in cui è presente chitosano, l'internalizzazione ed il consumo di saccarosio siano stati più lenti rispetto alle fermentazioni F2a e F3 non trattate. Contemporaneamente il glucosio ha mantenuto valori inferiori a quelli di saccarosio, contrariamente a quanto avveniva nelle fermentazioni controllo (Figure 29, 34 e 39).



**Figura 39.** Saccarosio e glucosio in terreno e cellule nelle colture di Barbera (*Vitis vinifera*) in bioreattore alimentate con 30 g/L (F2c) e 10 g/L (F4) di saccarosio al giorno 0 e trattate con chitosano 50 µg/mL. I dati sono la media di 3 campioni (repliche biologiche) ± SD.

Il resveratrolo osservato in F2c è di un ordine di grandezza superiore a quello quantificato in F4, ed anche a quello di F2a, F2b e F3, ed è stato soprattutto secreto nel terreno (Figure 30, 35 e 40). Il *trans*-resveratrolo intracellulare non ha superato le 400 nmol/gDW né in F2c né in F4, mentre il *cis* in F2c ha raggiunto le 2000 nmol/gDW, più del doppio che in F4. Nel terreno di F2c si è osservato un rilascio crescente di *cis*-resveratrolo fino a quasi 5000

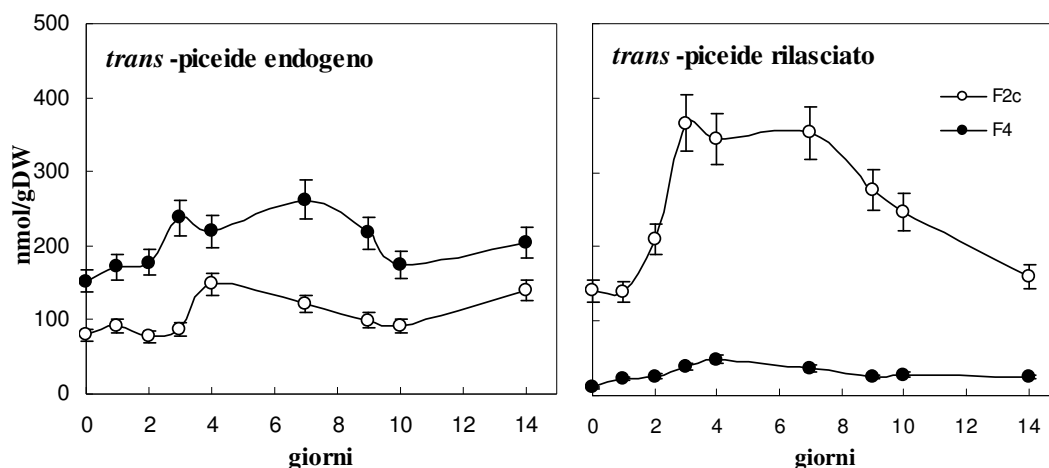
nmol/gDW ed un accumulo a partire dal giorno 4. In F4 i due composti hanno andamento più costante, con livelli inferiori alle 50 nmol/gFW (Figura 40).



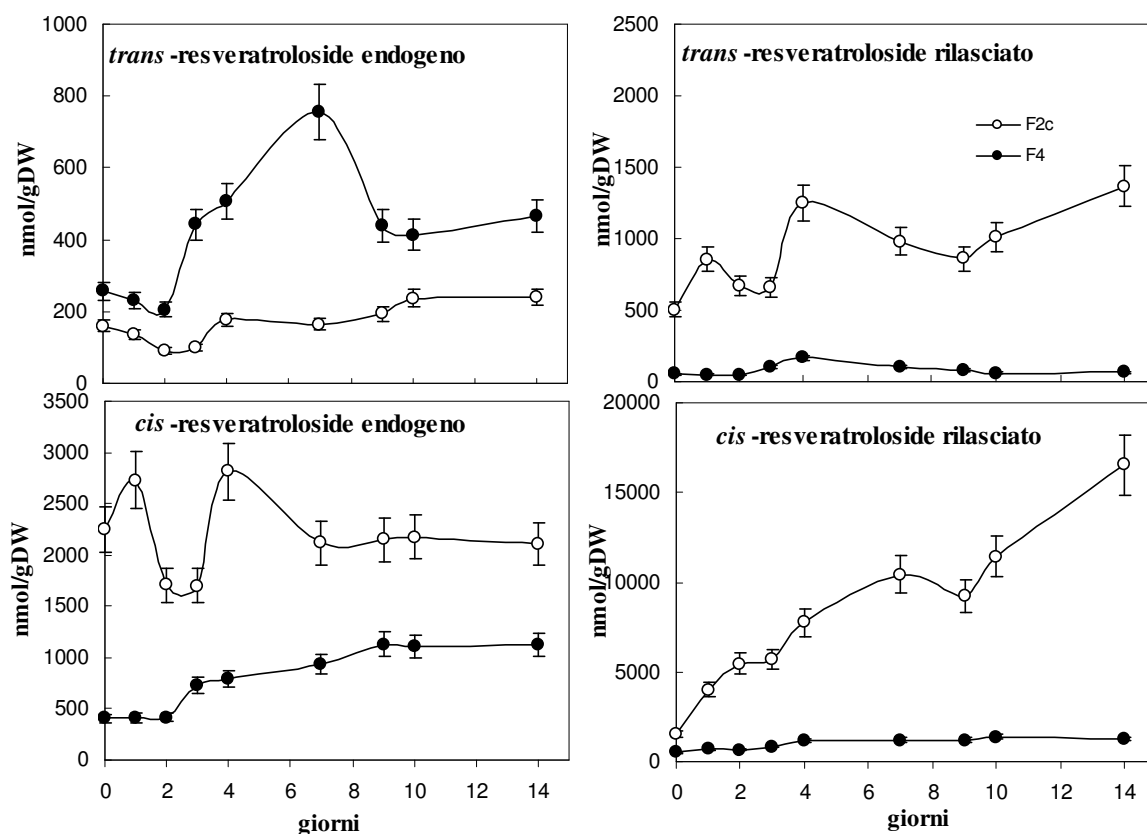
**Figura 40.** *Trans* e *cis*-resveratrolo determinato tramite analisi HPLC-DAD all'interno delle cellule e nel terreno delle colture di cellule di Barbera (*Vitis vinifera*) delle fermentazioni F2c e F4, trattate con chitosano 50 µg/mL. I dati sono la media di 3 campioni  $\pm$  SD.

Il *cis*-piceide è risultato assente in tutte le fermentazioni, mentre il *trans*, in tracce in F2a e F3, è stato rilevato in quantità significative ma inferiori a quelle del resveratroloside e con andamenti più o meno costanti. In F2c è stato più rilasciato che accumulato, viceversa in F4 (Figura 41).

Il *trans*-resveratroloside in F2c e F4 ha mostrato lo stesso andamento che in F2a e F3, cioè è rimasto costante a livelli di un ordine di grandezza in meno del *cis*, ad eccezione delle cellule di F4 dove ha mostrato un picco di 800 nmol/gDW al giorno 7. Il *cis*-resveratroloside intracellulare in F2c ha avuto livelli altalenanti fra le 1500 e le 3000 nmol/gDW e nella seconda settimana di coltura si è stabilizzato attorno alle 2000 nmol/gDW, mentre nel terreno è aumentato linearmente fino a superare le 17000 nmol/gDW (andamenti differenti e valori circa doppi rispetto a F2a). In F4 il *cis*-resveratroloside in cellule e terreno è incrementato gradatamente fino a circa 1100-1300 nmol/gDW, livello oltre 10 volte inferiore rispetto a F2c (Figura 42).



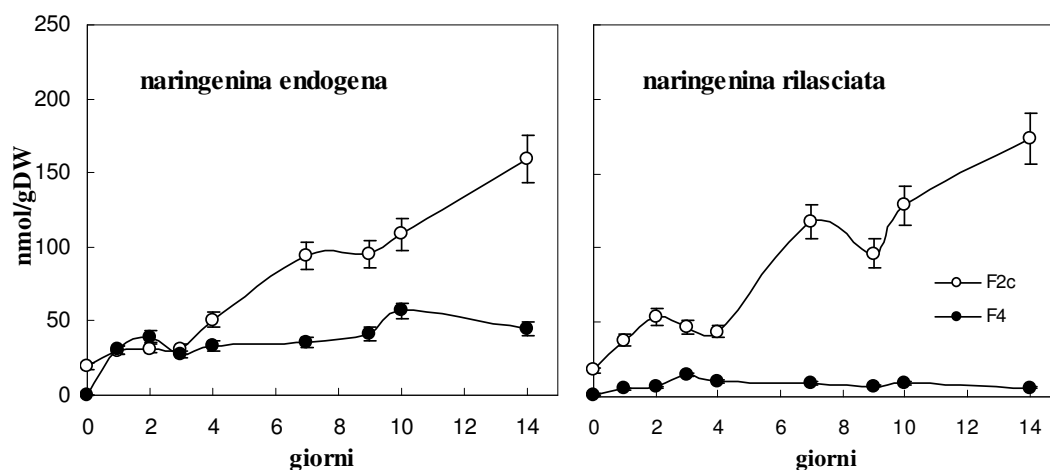
**Figura 41.** *Trans*-piceide determinato tramite analisi HPLC-DAD all'interno delle cellule e nel terreno delle colture di cellule di Barbera (*Vitis vinifera*) delle fermentazioni F2c e F4, trattate con chitosano 50 µg/mL. Il *cis*-piceide era assente o presente in tracce. I dati sono la media di 3 campioni ± SD.



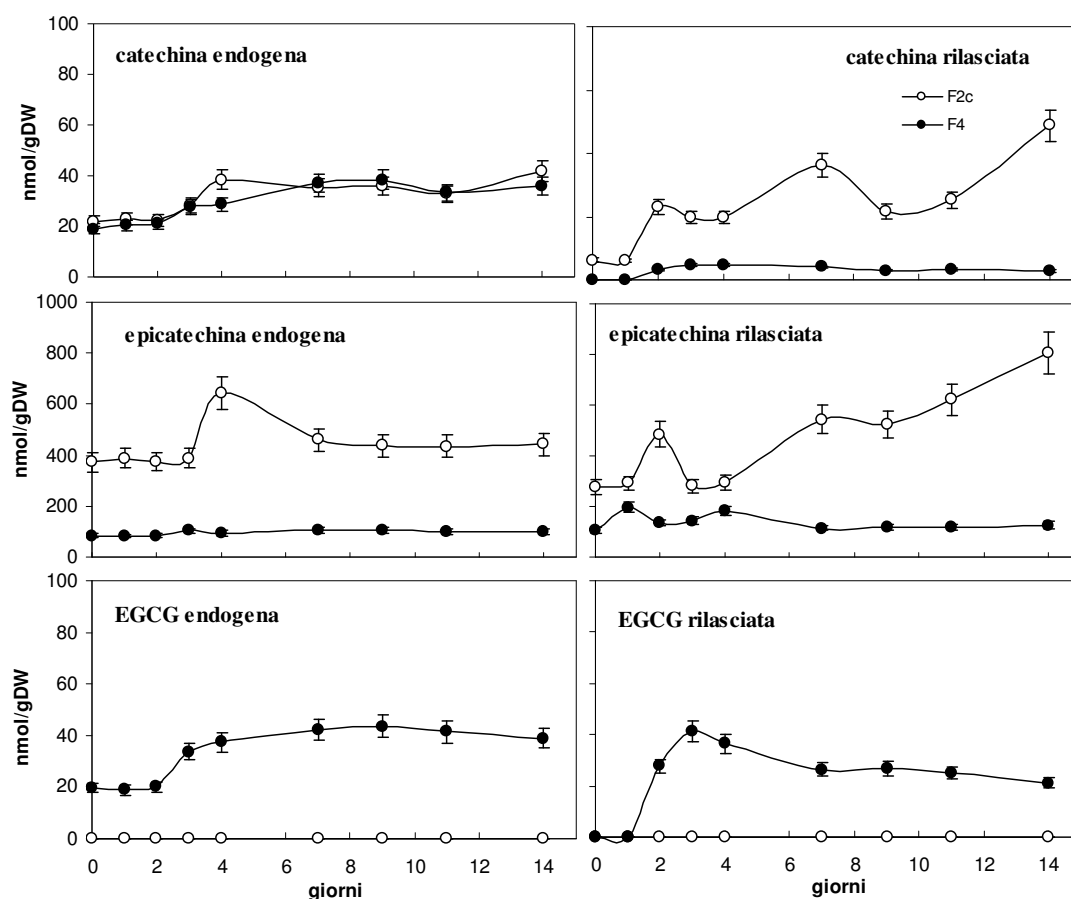
**Figura 42.** *Trans*- e *cis*-resveratrolside determinati tramite analisi HPLC-DAD all'interno delle cellule e nel terreno delle colture di cellule di Barbera (*Vitis vinifera*) delle fermentazioni F2c e F4, trattate con chitosano 50 µg/mL. I dati sono la media di 3 campioni ± SD.

I flavonoidi nelle fermentazioni trattate con chitosano sono scarsamente presenti.

La naringenina in F2c è aumentata linearmente ma non ha superato le 200 nmol/gDW né nell'accumulo né nel rilascio. Valori molto minori sono stati rilevati in F4 (Figura 43). Rutina e quercetina erano presenti in tracce.



**Figura 43.** Naringenina determinata tramite analisi HPLC-DAD all'interno delle cellule e nel terreno delle colture di cellule di Barbera (*Vitis vinifera*) delle fermentazioni F2c e F4, trattate con chitosano 50 µg/mL. I dati sono la media di 3 campioni  $\pm$  SD.



**Figura 44.** Catechina, epicatechina ed epigallo catechina gallata (EGCG) determinate tramite analisi HPLC-DAD all'interno delle cellule e nel terreno delle colture di cellule di Barbera (*Vitis vinifera*) delle fermentazioni F2c e F4, trattate con chitosano 50 µg/mL. I dati sono la media di 3 campioni  $\pm$  SD.

La catechina nelle cellule di F2c e F4 era presente in tracce (meno di 40 nmol/gDW), mentre per quel che riguarda il terreno solo in F2c ha mostrato livelli apprezzabili, aumentando fino a 60 nmol/gDW il giorno 14 (Figura 44).

In F2c la quantità di epicatechina in F2c è variata fra le 300 e le 700 nmol/gDW sia all'interno delle cellule che nel terreno, mentre in F4 ha raggiunto le 200 nmol/gDW solo al giorno 2 (Figura 44). Nelle corrispondenti fermentazioni non trattate con chitosano, F2a e F3, il rilascio raggiungeva 600 e 1200 nmol/gDW rispettivamente (Figura 33).

L'EGCG è risultata presente in tracce in F2c e F4, contrariamente a quanto avveniva nelle fermentazioni non elicitate (Figure 33 e 44).

L'acido cinnamico è risultato presente in tracce in F4 e nel terreno di F2c, mentre nelle cellule di F2c era presente con valori scarsamente rilevabili. L'acido caffeico e l'acido clorogenico erano sempre presenti in tracce.

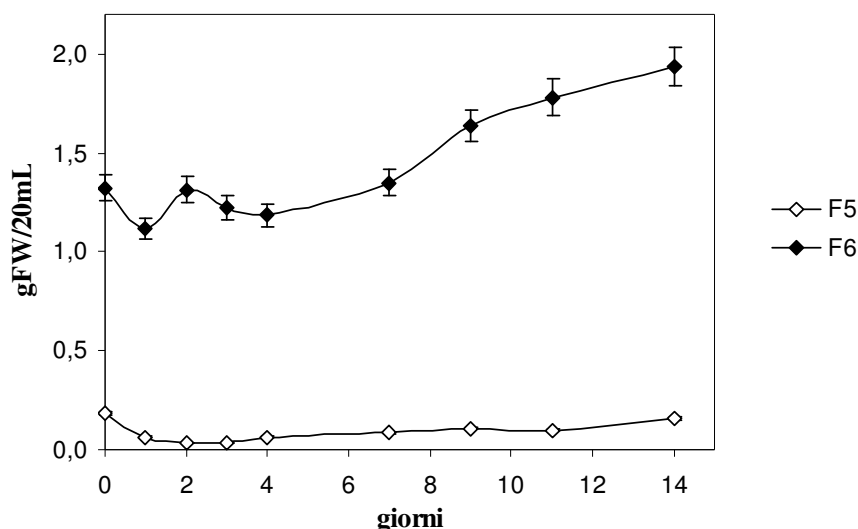
Anche l'acido gallico era assente o presente in tracce all'interno delle cellule e nei terreni.

Piceatannolo, calcone, kaemferolo, epicatechina gallata, epigallo catechina, acido *p*-cumarico, acido *trans*-ferulico e acido sinapico non sono stati quantificati in quanto la metodica separativa è stata messa a punto successivamente.

## **6.5 Fermentazioni 5 e 6: concentrazione cellulare dell'inoculo**

Allo scopo di ottimizzare la concentrazione cellulare (in termini di peso fresco, gFW) dell'inoculo, sono state eseguite in parallelo le fermentazioni F5 e F6. Le cellule per l'inoculo provenivano dalla stessa coltura suddivisa non equamente fra i due bioreattori. La F5 è stata inoculata con 7,5 gFW (0,19 gFW/20 mL) e la F6 con 53 g (1,32 gFW/20 mL), entrambi in un volume di 800 mL di terreno contenente 10 g/L di saccarosio. Nei due casi si è osservato un calo del peso fresco fra il giorno 0 e l'1, come in quasi tutte le fermentazioni precedenti, poi è cominciata la crescita cellulare, più lenta durante la prima settimana di coltura rispetto alla seconda (Figura 45). I TMD calcolati fra il giorno 0 ed il 14 sono di 27,5 giorni per F6 e addirittura negativo per F5 (come se le cellule non crescessero), ma se li si calcola fra i giorni 1 e 14, cioè escludendo la perdita di cellule iniziale, sono di 17,7 giorni in F6 e 11,1 in F5.

In entrambe le fermentazioni il numero di cellule ha rispecchiato quello del peso fresco, la vitalità è sempre rimasta superiore all'80 % ed il pH ha seguito l'andamento classico (dati non mostrati).



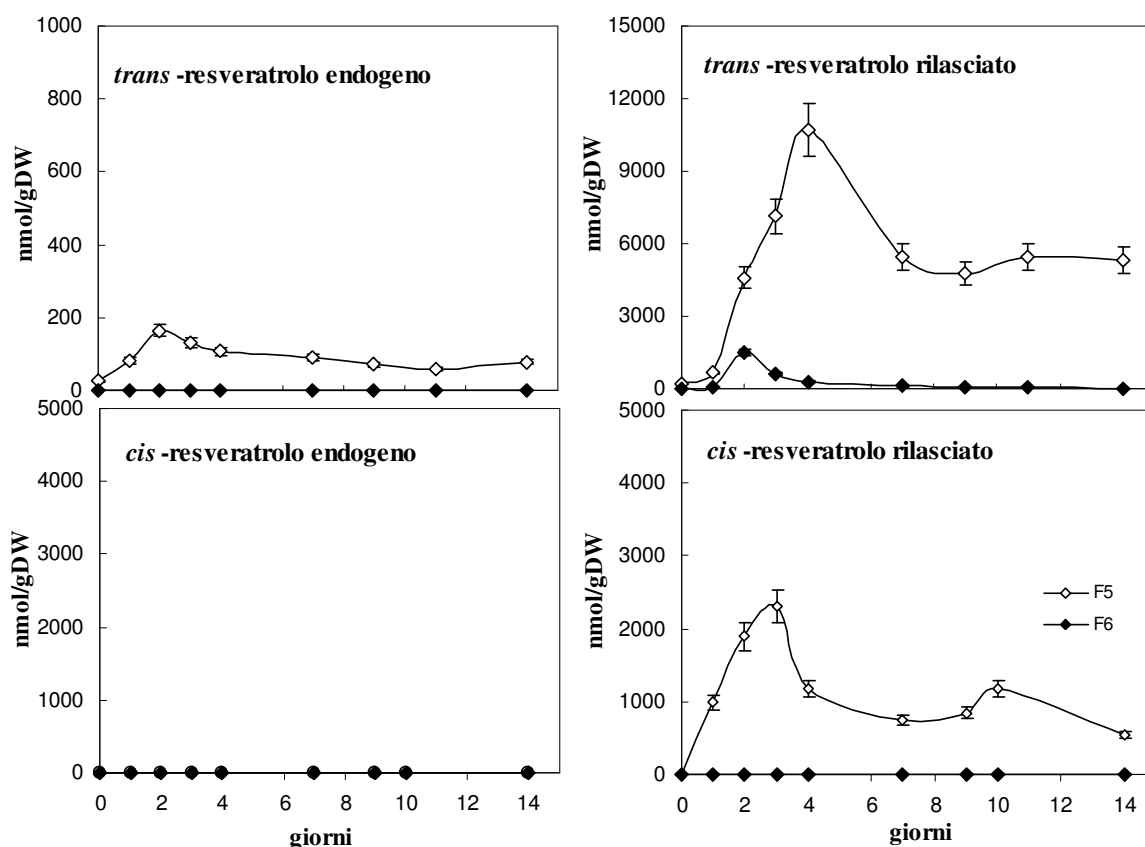
**Figura 45.** Peso fresco, espresso in g/20 mL, nelle colture di cellule di Barbera (*Vitis vinifera*) cresciute in bioreattore nelle condizioni definite per F5 e F6, differenti per la concentrazione dell'inoculo. I dati sono la media di 3 campioni  $\pm$  SD.

Per quel che riguarda la produzione di polifenoli, le due fermentazioni si sono comportate in maniera molto diversa.

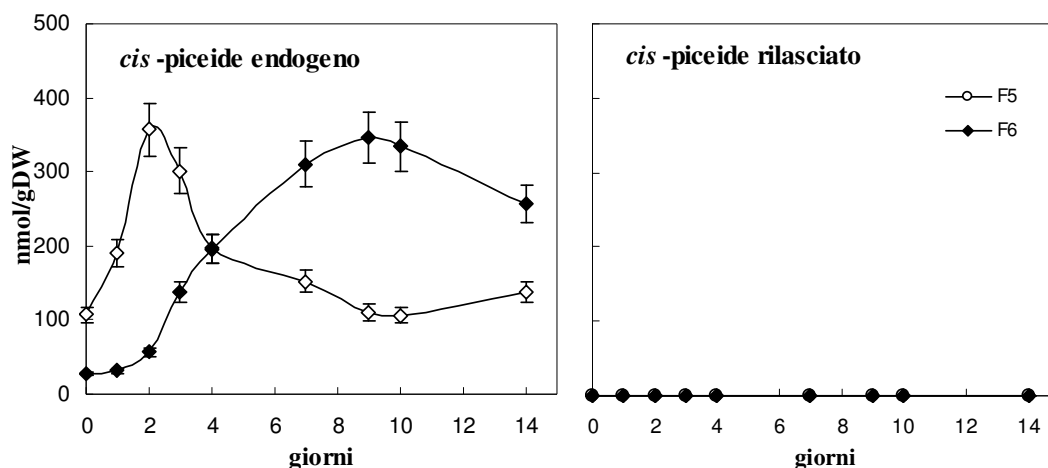
Il *trans*-resveratrolo all'interno delle cellule è risultato presente solo in F5, dove ha raggiunto le 200 nmol/gDW al giorno 2 e poi si è assestato intorno alle 60 nmol/gDW. La quantità rilasciata nel terreno è stata molto maggiore ed anche in questo caso in F6 è stata appena rilevabile, ma con un picco al giorno 2 di 1500 nmol/gDW. Nel terreno di F5 il massimo è stato raggiunto al giorno 4, con 11000 nmol/gDW, e poi il rilascio si è stabilizzato intorno alle 5000-5500 nmol/gDW. L'isomero *cis* è risultato assente all'interno delle cellule in entrambe le fermentazioni e pure nel terreno di F6. In F5, invece è stato rilasciato con un picco di circa 2300 nmol/gDW al giorno 3 e poi costantemente attorno alle 1000 nmol/gDW (Figura 46).

Per quel che riguarda i derivati monoglucosilati del resveratrolo, all'interno delle cellule il *trans*-piceide è risultato sempre assente, mentre il *cis* è stato rilevato solo intracellulare in F6, al di sotto delle 100 nmol/gDW, mentre in F5 nei giorni 2 e 3 ha superato le 350 nmol/gDW. Il piceide non è stato rilasciato nel terreno, né in forma *trans*, né *cis* (Figura 47). Il resveratroloside intracellulare è stato osservato solo in forma *trans*, con un picco di 200-250 nmol/gDW ai giorni 2 e 3 e poi si è stabilizzato attorno alle 100 nmol/gDW in F5, mentre è risultato costante attorno alle 80 nmol/gDW in F6. Il resveratroloside è stato secreto in quantità significative solo in F5 dove l'isomero *trans* ha raggiunto un picco intorno alle 1000 nmol/gDW e poi si è assestato sulle 400 nmol/gDW, mentre il *cis* ha mostrato un andamento analogo ma con valori doppi (Figura 48).

Il piceatannolo intracellulare è stato rilevato in F5, dove è aumentato fino alle 350 nmol/gFW al giorno 9 per poi calare, mentre in F6 lo si è riscontrato in quantità significative solo nel terreno, in cui raggiunge le 250 nmol/gDW nei giorni dall'1 al 3 e al 10. Nelle cellule di F6 e nel terreno di F5 il piceatannolo era presente in tracce (Figura 49).

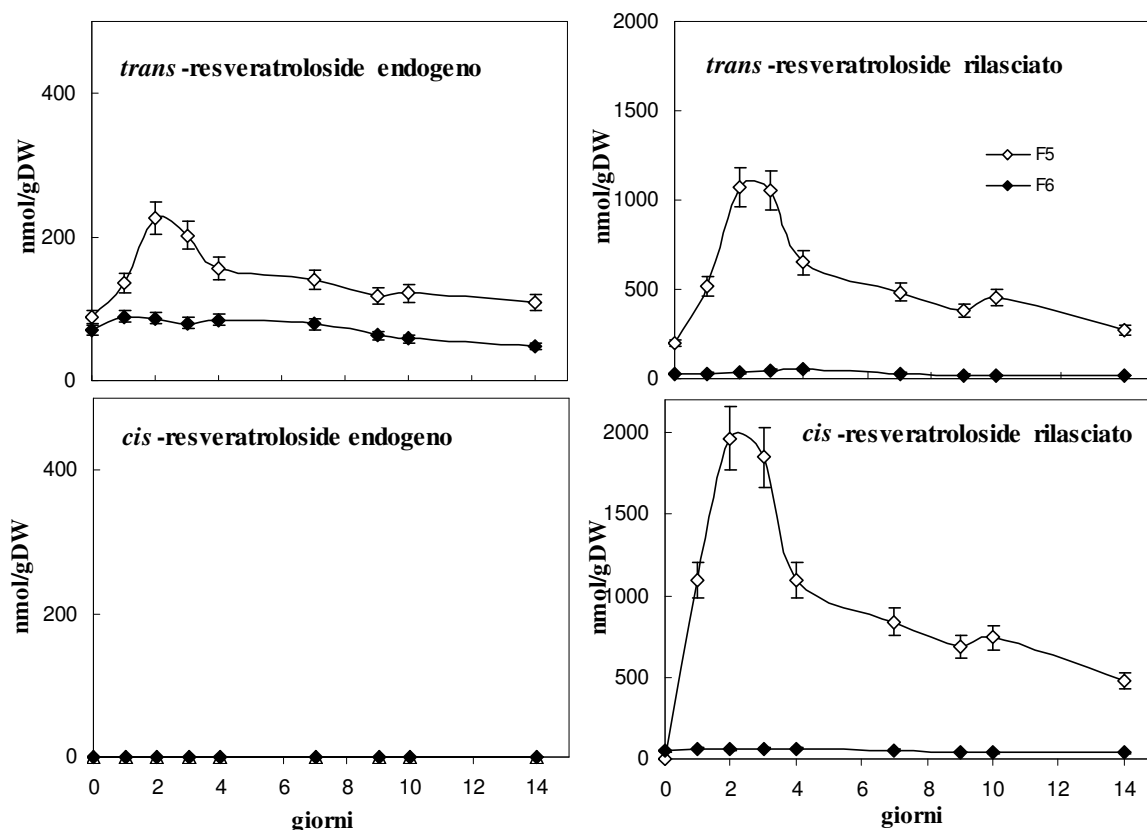


**Figura 46.** *Trans* e *cis*-resveratrolo determinato tramite analisi HPLC-DAD all'interno delle cellule e nel terreno delle colture di cellule di Barbera (*Vitis vinifera*) delle fermentazioni F5 e F6, differenti per la concentrazione dell'inoculo. I dati sono la media di 3 campioni  $\pm$  SD.

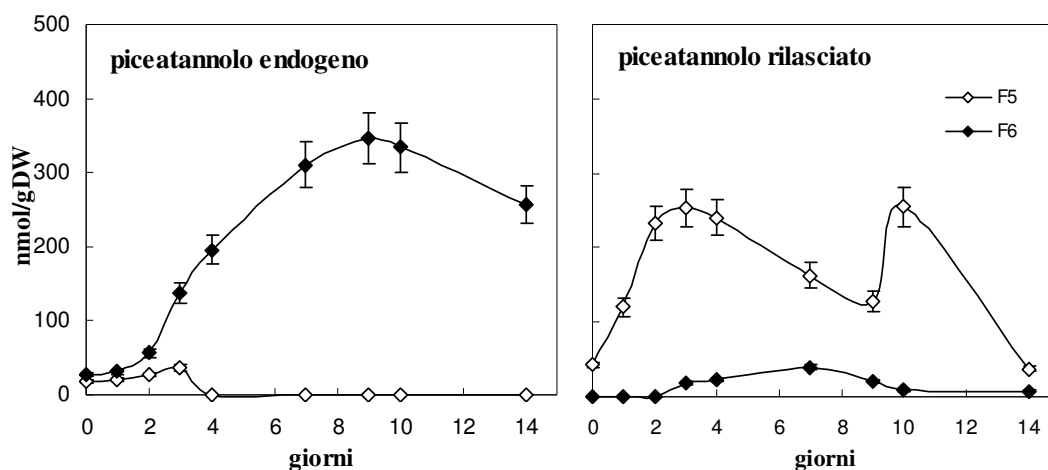


**Figura 47.** *Cis*-piceide determinato tramite analisi HPLC-DAD all'interno delle cellule e nel terreno delle colture di cellule di Barbera (*Vitis vinifera*) delle fermentazioni F5 e F6, differenti per la concentrazione dell'inoculo. Il *trans*-piceide è assente o presente in tracce. I dati sono la media di 3 campioni  $\pm$  SD.





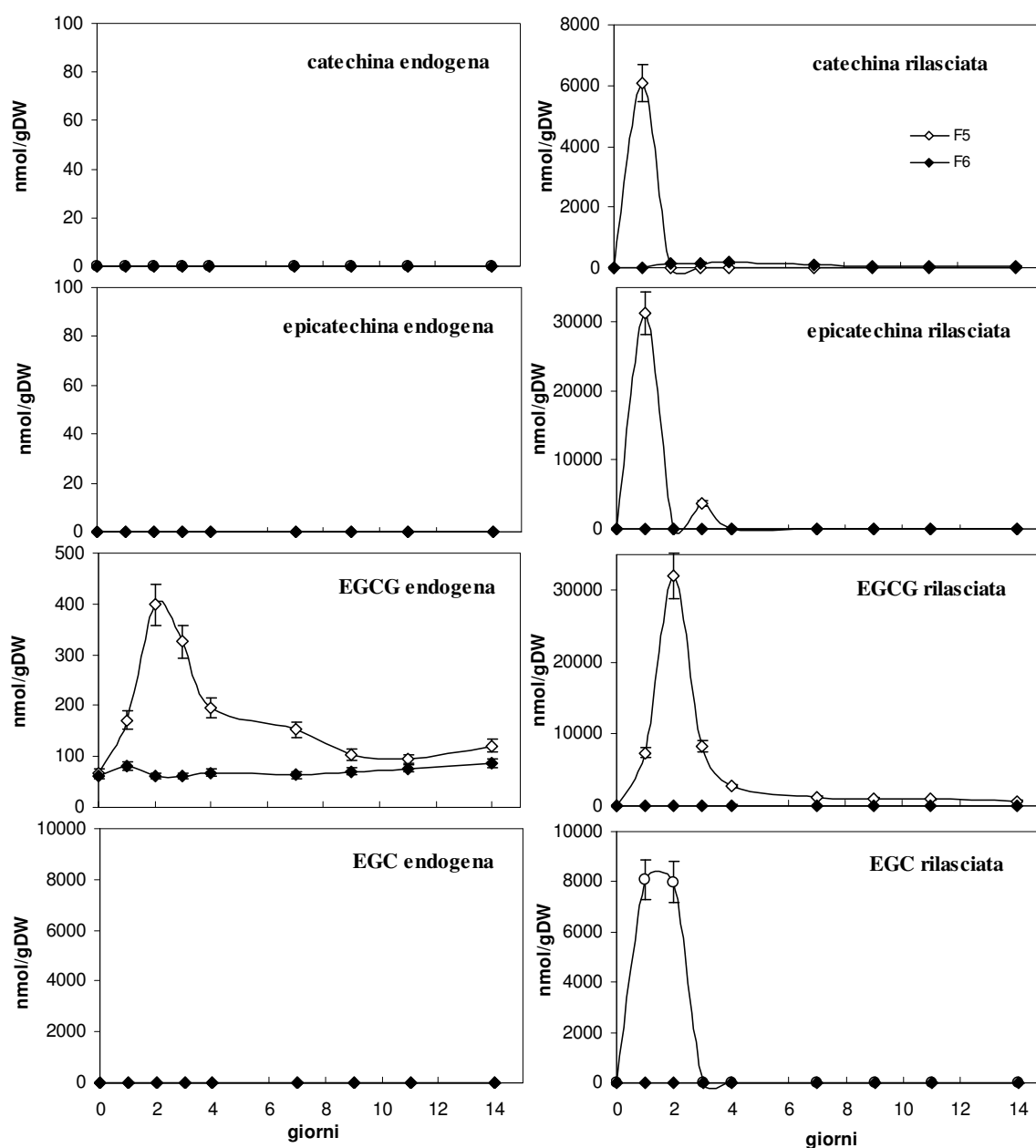
**Figura 48.** *Trans*- e *cis*-resveratroloside determinati tramite analisi HPLC-DAD all'interno delle cellule e nel terreno delle colture di cellule di Barbera (*Vitis vinifera*) delle fermentazioni F5 e F6, differenti per la concentrazione dell'inoculo. I dati sono la media di 3 campioni  $\pm$  SD.



**Figura 49.** Picatannolo determinato tramite analisi HPLC-DAD all'interno delle cellule e nel terreno delle colture di cellule di Barbera (*Vitis vinifera*) delle fermentazioni F5 e F6, differenti per la concentrazione dell'inoculo. I dati sono la media di 3 campioni  $\pm$  SD.

Le catechine in F5 e F6 sono risultate presenti a livelli minori degli stilbeni, solo nei primi giorni di coltura e quasi esclusivamente rilasciate nel terreno. L'unico composto della famiglia trovato in quantità apprezzabili all'interno delle cellule è la EGCG che in F6 era

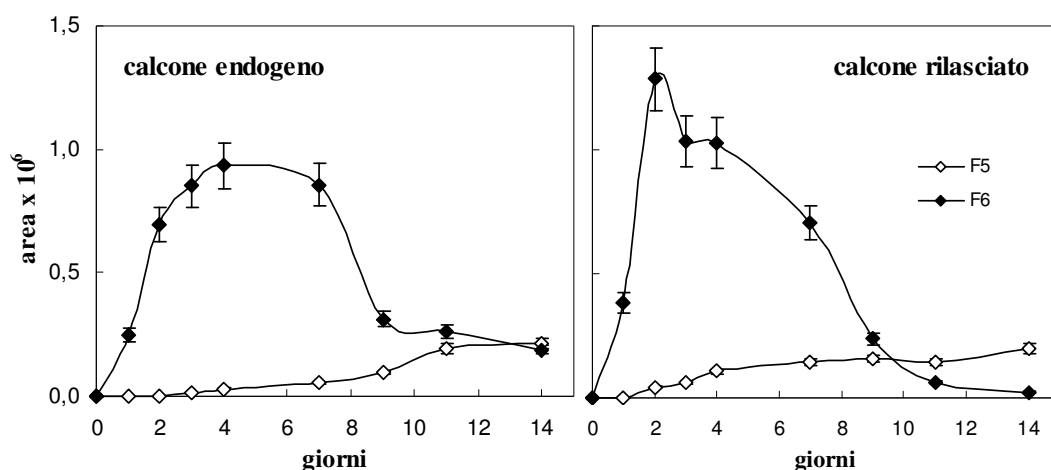
presente ad un livello costante intorno alle 60 nmol/gDW ed in F5 ha raggiunto un picco di 400 nmol/gDW al giorno 2 (Figura 50). Nel terreno di F5 la EGCG e l'epicatechina hanno, mentre la catechina e l'EGC hanno mostrato un massimo di rilascio di circa 6000 nmol/gDW e 8000 nmol/gFW rispettivamente ai giorni 1 e 2. I livelli di rilascio delle catechine raggiunti nel terreno di F6 sono trascurabili se confrontati con quelli di F5: la più concentrata è risultata essere la catechina che non raggiunge le 170 nmol/gDW (Figura 50).



**Figura 50.** Catechina, epicatechina, epigallo catechina gallata (EGCG) ed epigallo catechina (EGC) determinate tramite analisi HPLC-DAD all'interno delle cellule e nel terreno delle colture di cellule di Barbera (*Vitis vinifera*) delle fermentazioni F5 e F6, differenti per la concentrazione dell'inoculo. I dati sono la media di 3 campioni  $\pm$  SD.

Il calcone, il primo composto prodotto nella via biosintetica dei flavonoidi, ha mostrato un andamento opposto a quelli degli altri polifenoli quantificati. Esso, infatti, era presente in tracce in F5 mentre in F6 è stato abbondantemente prodotto. I dati ad esso riferiti non sono espressi in nmol/gDW ma in aree dei picchi cromatografici perché lo standard è stato sintetizzato in laboratorio e per problemi tecnici non è stato possibile determinarne la concentrazione. In F6 il calcone è stato accumulato nelle cellule con crescita quasi esponenziale dal giorno 1 al 4 e poi dal 7 è diminuito. Nel terreno è stato rilasciato in quantità massiccia al giorno 2, poi è rimasto stabile fino al 4 ed infine è calato progressivamente (Figura 51).

Epicatechina gallata, naringenina, kaemferolo, quercetina, rutina, acido gallico e gli acidi idrossicinnamici sono assenti o presenti in tracce.



**Figura 51.** Calcone determinato tramite analisi HPLC-DAD all'interno delle cellule e nel terreno delle colture di cellule di Barbera (*Vitis vinifera*) delle fermentazioni F5 e F6, differenti per la concentrazione dell'inoculo. I valori sono espressi come area sottesa al picco cromatografico. I dati sono la media di 3 campioni  $\pm$  SD.

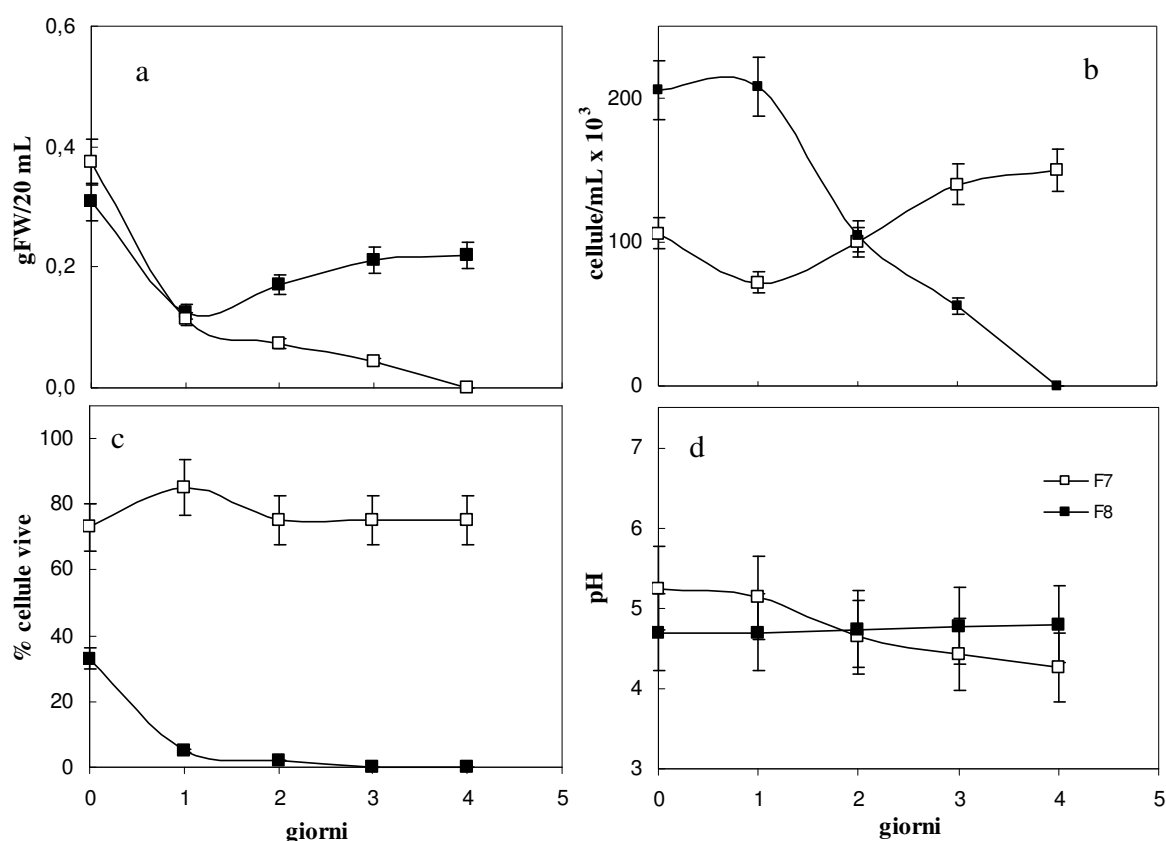
## 6.6 Fermentazioni 7 e 8: trattamento con chitosano 100 $\mu$ g/mL

La fermentazione F7 e la F8 sono state inoculate con una coltura identica (circa 0,34 gFW/20 ml) e condotte nelle medesime condizioni con l'unica differenza nel fatto che F8 è stata addizionata di chitosano alla concentrazione finale di 100  $\mu$ g/mL, mentre F7 non è stata trattata.

Immediatamente dopo l'aggiunta del chitosano si è osservata una forte flocculazione delle cellule.

Il chitosano a questa concentrazione è risultato essere tossico per la coltura, tanto che la percentuale di cellule vive in F8 è stata dimezzata rispetto al controllo F7 in tempi brevissimi, inferiori a quelli occorsi per eseguire l'analisi del giorno 0 (dopo 1-2 ore dall'inoculo), ha

raggiunto un valore intorno al 5 % in 24 ore e al giorno 2 era quasi pari a 0. Nello stesso periodo la vitalità della coltura controllo (F7) si è mantenuta al di sopra del 70 % (Figura 52c). Il corrispondente drastico calo in F8 è stato riscontrato anche nel peso fresco e nel numero di cellule di F8 (Figure 52a e 52b), mentre il pH non ha risentito del trattamento (Figura 52d). Per questo motivo la fermentazione è stata interrotta al quarto giorno e le analisi dei polifenoli prodotti non sono state eseguite.



**Figura 52.** Parametri di crescita delle colture di cellule di Barbera (*Vitis vinifera*) nelle fermentazioni F7 e F8, rispettivamente non trattata e addizionata di chitosano 100 µg/mL. (a) peso fresco espresso in g/20 mL; (b) conta cellulare espressa in numero di cellule/mL; (c) vitalità espressa come percentuale di cellule vive; (d) pH del terreno. I dati sono la media di 3 campioni  $\pm$  SD.

# **DISCUSSIONE**

## **1. ELICITAZIONE CON CHITOSANO: STUDI MOLECOLARI E METABOLICI**

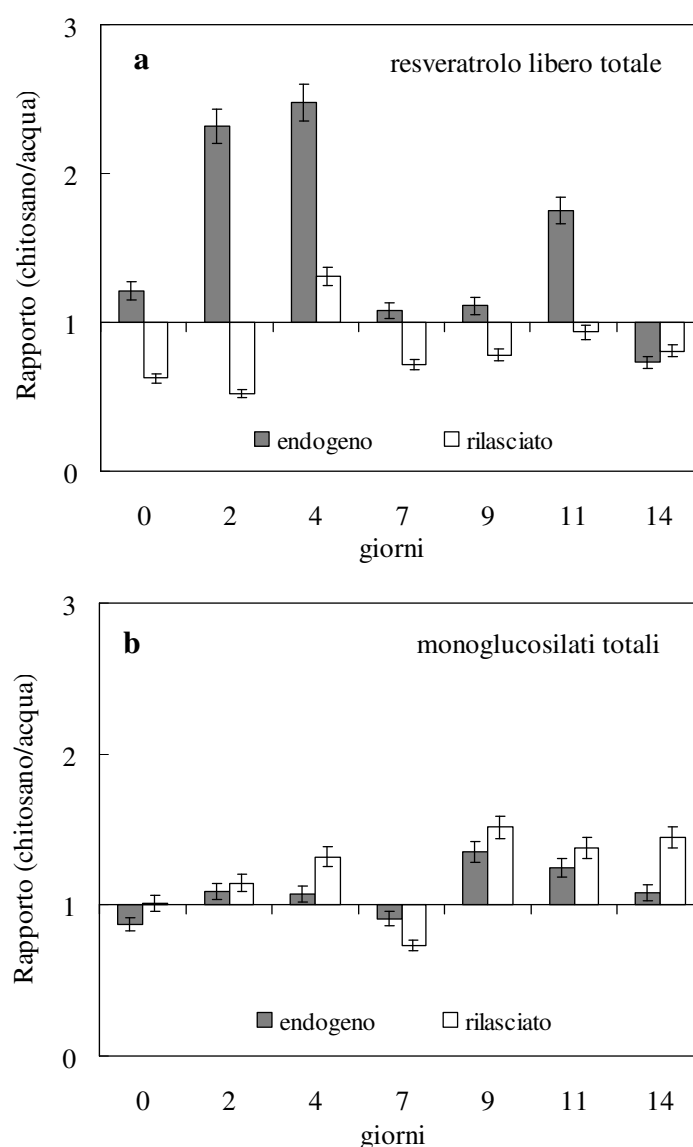
L'abilità del chitosano di indurre o migliorare la capacità delle piante di resistere all'attacco di agenti patogeni sembra essere direttamente proporzionale alla sua efficacia nello stimolare *in vitro* la produzione di molti composti implicati nei sistemi di difesa delle piante quali, per esempio, le fitoalessine (Rabea *et al.*, 2003). Il meccanismo d'azione del chitosano non è stato ancora completamente chiarito, ma la sua efficacia è certamente dipendente dal suo grado di polimerizzazione e di acetilazione (Kauss *et al.*, 1989; Hadwiger, 1999; Rabea *et al.*, 2003). Questo è stato osservato in diversi sistemi vegetali (Hadwiger, 1999; Faoro e Iriti, 2007) e io stessa l'ho confermato nelle sospensioni cellulari di picciolo di Barbera durante la Tesi di Laurea in cui si evidenziava che N-acetil-D-glucosammina e D-glucosammina (monomeri di chitina e chitosano rispettivamente) non hanno influenzato la crescita delle cellule, ma diminuiscono il rilascio di resveratrolo nei terreni di coltura e influiscono scarsamente sull'accumulo endogeno (Righetti *et al.*, 2007; Ferri *et al.*, 2008).

Le analisi eseguite sulle colture cellulari di picciolo di *Vitis vinifera* cv. Barbera, in boccetti da 20 mL, hanno dimostrato come il chitosano alla concentrazione di 50 µg/mL non influenzi significativamente la crescita e la vitalità delle cellule (Figura 13), mentre ha un effetto significativo sulla produzione di polifenoli, in particolare di stilbeni.

Il massimo contenuto endogeno di *trans*-resveratrolo è stato osservato dopo 4 giorni dal trattamento con chitosano, ed è risultato il 36 % e il 63 % superiore rispettivamente dei controlli con acido acetico e acqua. Contemporaneamente il chitosano ha diminuito il rilascio di *trans*-resveratrolo nel terreno di coltura del 62 % al giorno 2, rispetto al controllo con acido acetico (Figura 14). Il livello di *cis*-resveratrolo non è stato influenzato dal trattamento, con l'eccezione di una piccola riduzione del rilascio, ed è risultato circa 3 volte inferiore dell'isomero *trans* sia all'interno che all'esterno le cellule (Figura 14). Nei giorni di picco l'accumulo ed il rilascio di *trans*- e *cis*-resveratrolo superano di 10-15 volte i livelli presenti negli altri giorni di coltura (Figura 14). Piceide e resveratroloside, derivati monoglucosilati del resveratrolo, hanno mantenuto livelli endogeni e di rilascio nel terreno 2-4 volte superiori, con un andamento più costante rispetto alla forma libera, ed i singoli

isomeri sono influenzati in maniera scarsamente significativa dal trattamento con chitosano (Figure 15 e 16).

La distribuzione fra resveratrolo intracellulare e rilasciato risulta più chiara se si considera la quantità totale di resveratrolo libero (isomeri *trans* più *cis*) durante tutto il periodo di osservazione, normalizzata sui livelli del controllo in acqua, così da comprendere la somma degli effetti di acido acetico e chitosano (Figura 53a). È interessante notare come in questo modo si evidenzia un secondo picco di accumulo di resveratrolo al giorno 11, corrispondente al piccolo picco di espressione del gene della *STS* (Figura 21).



**Figura 53.** Rapporti dei livelli del resveratrolo libero totale (somma degli isomeri *trans* e *cis*) e dei monoglucosilati totali (somma di piceide e resveratroloside, isomeri *trans* e *cis*), calcolati normalizzando la quantità totale delle colture trattate con chitosano 50 µg/mL con la quantità delle colture non trattate (controllo acqua). (a) resveratrolo totale endogeno e rilasciato; (b) stilbeni monoglucosilati totali endogeni e rilasciati.

Considerando la quantità totale di monoglucosidi (resveratroloside più piceide, isomeri *trans* più *cis*), normalizzata per il controllo relativo in acqua, è possibile osservare un aumento sia di accumulo che di rilascio di questi composti nelle cellule trattate con chitosano, durante tutto il periodo di coltura e specialmente nella seconda settimana (Figura 53b). Lo stesso andamento, inoltre, è stato ottenuto normalizzando i dati riferiti al trattamento con chitosano per il controllo con acido acetico, anche se l'effetto è meno pronunciato, a confermare che l'acido acetico ha un leggero potere elicitorio. Poiché esiste un ordine di grandezza di differenza fra i livelli totali di resveratrolo libero e glucosilato, un aumento di 1 volta del valore del rapporto chitosano/acqua dei glucosidi corrisponde ad una variazione di 10 volte della forma libera (Figure 53a e 53b). Comunque, considerati i dati attuali, non è possibile collegare direttamente la diminuzione del resveratrolo libero (Figura 14) con la formazione di nessuna delle forme *trans* o *cis* di resveratroloside e piceide (Figure 15 e 16).

La rapida diminuzione dell'accumulo endogeno *trans*-resveratrolo dopo il giorno 4 di coltura (Figura 14), potrebbe essere spiegata semplicemente con una diminuita attività di sintesi dovuta alla minore presenza di enzimi biosintetici. Ciò potrebbe essere dimostrato indirettamente dalle analisi di espressione tramite northern blot, che mostrano livelli decrescenti di mRNA della fenilalanina ammonio liasi (*PAL*) e di stilbene sintasi (*STS*) a partire dal giorno 4 (Figura 21). Potrebbero, inoltre, essere in atto processi di ossidazione del resveratrolo dovuto all'azione di perossidasi (Pervaiz, 2003) e/o la formazione di differenti tipi di stilbeni, come mono e diglucosidi ed oligomeri di resveratrolo. Infatti, anche se il piceide ed il resveratroloside sono i due monoglucosidi del resveratrolo più abbondanti nelle sospensioni di cellule di vite (Waffo Tegu et al., 1996a; Waffo Tegu et al., 1998), non si può escludere la formazione di altri stilbeni non analizzati in questa Tesi, quali astringina (Waffo Tegu et al., 1998), diglucosidi (Waffo Tegu et al., 2001; Decendit et al., 2002) o viniferine (Pezet et al., 2003). Analogamente al *trans*-resveratrolo libero, i monoglucosidi hanno mostrato un massimo di produzione durante la fase esponenziale di crescita delle cellule e sono diminuiti durante la fase stazionaria (Figure 15 e 16) (Waffo Tegu et al., 1996; Tassoni et al., 2005), confermando l'ipotesi di un accoppiamento della produzione degli stilbeni e dello sviluppo delle cellule, come già dimostrato per i tannini condensati (Decendit e Mérillon, 1996). Lo stesso sembra valere anche per le catechine, gli unici flavonoidi presenti in quantità significative (circa allo stesso livello del *trans*-piceide), fra quelli analizzati. Infatti catechina, epicatechina ed

EGCG sono accumulate e/o secrete maggiormente durante i primi 9 giorni di coltura (Figura 17).

Prendendo in considerazione gli enzimi principali coinvolti nella via dei fenilpropanoidi a cui appartengono sia gli stilbeni che i flavonoidi, è stato osservato un piccolo aumento di trascrizione dell'mRNA della *PAL* (Figura 21), mentre la proteina *PAL* non è stata identificata nelle analisi proteomiche fra quelle i cui livelli variano significativamente dopo il trattamento con l'elicitore chitosano. Risultati precedenti, ottenuti con sospensioni cellulari di *Vitis* (cv. Optima), avevano riportato una espressione coordinata ed "elicitore-dipendente" di *PAL* e *STS* 6 ore dopo il trattamento con estratti totali della parete fungina di *P. cambivora* (Melchior e Kindl, 1991). Lo stesso studio aveva dimostrato come le attività enzimatiche dei due enzimi non rispecchiassero esattamente la loro espressione genica, imputando queste differenze a diverse velocità di degradazione degli mRNA o a modificazioni post-traduzionali. I diversi tempi di espressione ed andamenti dei livelli di mRNA osservati fra le cultivar Optima e Barbera, potrebbero essere dovuti a differenze genetiche fra le cultivar, a diverse condizioni di coltura o all'uso di chitosano puro, anziché di estratti fungini che possono contenere anche altre molecole attive nello stimolare le difese della pianta contro l'attacco dell'agente patogeno.

Le analisi proteomiche (Figure 19, 24 e 25 e Tabelle 1, 2 e 3) suggeriscono che l'aumento di resveratrolo sia il risultato di un'attività biosintetica *de-novo* di quelle proteine (principalmente *STS*) il cui accumulo è stato specificamente promosso dalla presenza dell'elicitore, piuttosto che di una rimobilizzazione dei monoglucosidi immagazzinati o precedentemente prodotti. Questa ipotesi sembrerebbe dimostrata dalle analisi proteomiche degli estratti proteici totali di cellule trattate con chitosano al giorno 4 (picco di produzione del *trans*-resveratrolo), trovando conferma nelle analisi eseguite sulle frazioni subcellulari di proteine solubili e di membrana. Infatti il chitosano ha un effetto specifico nell'aumentare i livelli di sei differenti spots proteici di stilbene sintasi (*STS Vst1*), rispetto ai controlli in acqua e con acido acetico (Figura 19, spots 43-48). L'analisi dei gel 2D ha mostrato un aumento fra le 3,2 e le 10,1 volte delle 6 *STS* rispetto al controllo con acido acetico, e fra 3,7 e 6,2 volte rispetto al controllo in acqua (Tabella 1). Numerose isoforme geniche della *STS* sono state riportate (Melchior e Kindl, 1991; Wiese *et al.*, 1994), ma tutte e 6 queste proteine corrispondono alla isoforma 1 della stilbene sintasi (*STS Vst1*), che sembra quindi essere l'unica indotta dal chitosano, almeno per quanto rivelato dalle analisi di elettroforesi bidimensionale con colorazione Sypro Ruby. Inoltre, le analisi di northern blot non hanno



mostrato un aumento significativo del trascritto della *STS* in seguito al trattamento con l'elicitore (Figura 21), confermando che la regolazione dell'espressione proteica di *STS* avviene a livello post-traduzionale, come già ipotizzato da Melchior e Kindl (1991).

Analizzando *in silico* (programma NetPhos 2.0; [www.cbs.dtu.dk](http://www.cbs.dtu.dk)) la sequenza amminoacidica della stilbene sintasi, sono stati previsti dodici possibili siti di fosforilazione con un punteggio superiore a 0,75 (con soglia di significatività 0,5). Come dimostrato colorando i gel con Pro-Q Diamond (colorante specifico per le proteine fosforilate), la presenza del treno di 6 *STS* (stesso peso molecolare ma diverso punto isoelettrico, Figura 19d-f, spots 43-48), corrispondenti tutte alla isoforma Vst1, è dovuta a 6 diversi gradi di fosforilazione della stessa proteina (Figura 20).

Risultati precedenti ottenuti sulle sospensioni di cellule di piccioli di Barbera trattate con metil-giasmonato 10  $\mu$ M (MeJA), avevano dimostrato come il MeJA inducesse l'accumulo di solo 4 proteine *STS* Vst1, indicando pertanto un effetto più forte del chitosano rispetto al MeJA, come confermato dalla quantità del 30 % più elevata di *trans*-resveratrolo endogeno nelle cellule trattate con chitosano (Figura 14) rispetto a quelle addizionate con MeJA (Tassoni *et al.*, 2005).

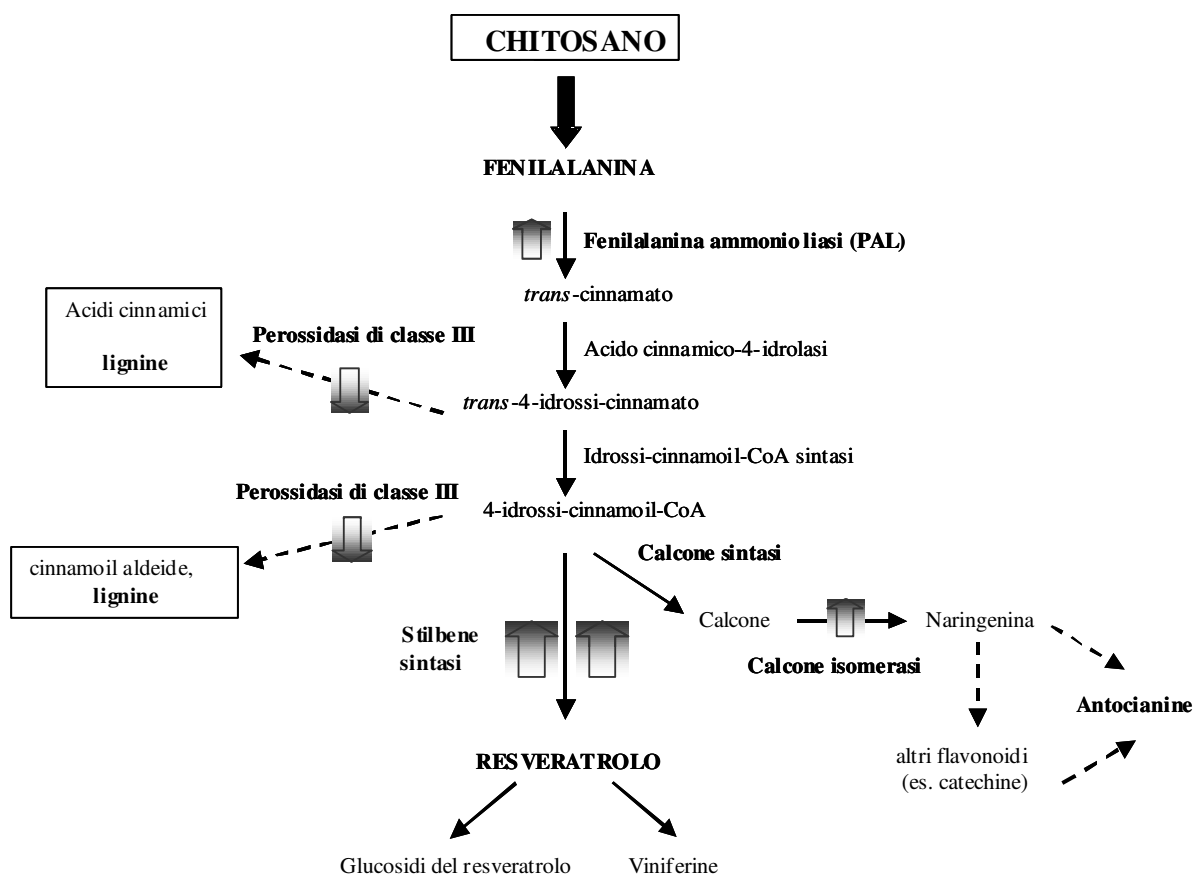
Fra i risultati ottenuti dalle analisi proteomiche sulla frazione subcellulare di membrana, va sottolineato come il chitosano induca variazioni nell'accumulo di 5 proteine coinvolte nella formazione o nella regolazione di vari tipi di canali transmembrana (Figura 25 e Tabella 3, spots 2, 28, 45, 48 e 49). Questa osservazione potrebbe confermare uno dei meccanismi con cui il chitosano agisce, cioè alterando la permeabilità cellulare. Hadwiger (1999) e Rabea e collaboratori (2003) avevano attribuito l'alterata funzionalità della membrana al legame ionico che gli oligomeri attivi di chitosano, che è un policatione, possono instaurare con le numerose cariche negative esposte all'esterno della cellula, in particolare aumentando l'assorbimento di ioni  $\text{Ca}^{++}$  e l'efflusso di ioni  $\text{K}^{+}$ . Tuttavia, il fatto che fra le proteine su cui il trattamento ha un forte effetto (aumento di 12,7 volte rispetto al controllo acqua e di 6,7 rispetto al controllo con acido acetico) vi sia una subunità  $\beta$  di un canale per il potassio (Figura 25 e Tabella 3, spot 45), fa pensare che l'interazione ionica non sia l'unico modo con cui la permeabilità viene alterata, ma che vi sia un effetto specifico anche sull'espressione delle proteine che formano i canali ionici. È quindi possibile che anche la diminuzione del rilascio di *trans*- e *cis*-resveratrolo causata dal chitosano (mentre il solo acido acetico lo aumenta, Figura 14) ed evidenziata dalle analisi HPLC-DAD, sia imputabile ad una alterata funzionalità della membrana plasmatica.

Riguardo agli enzimi coinvolti nella biosintesi dei flavonoidi, le analisi di espressione tramite northern blot hanno mostrato, nelle cellule trattate con chitosano, un livello più elevato di calcone sintasi (CHS, Figura 21), enzima che ha in comune con la STS gli stessi substrati e catalizza la formazione del calcone, e, in particolare a partire dal giorno 7, della calcone-flavanone isomerasi (CHI, Figura 21) che catalizza l'isomerizzazione del calcone a naringenina (Figura 54). In aggiunta, le analisi proteomiche degli estratti totali (Figura 19, spots 22 e 23) hanno mostrato un accumulo 2,4–3,3 volte maggiore (Tabella 1) della proteina di CHI dopo il trattamento con chitosano, mentre la CHS non è variata significativamente. Le analisi HPLC-DAD hanno rilevato soltanto tracce di naringenina e di quercetina, facendo ipotizzare un rapido utilizzo di questi composti come precursori per la sintesi degli antociani. Infatti, le determinazioni spettrofotometriche hanno mostrato un aumento di circa il 30 % al giorno 7 (Figura 18) dei livelli totali di antociani in cellule trattate con chitosano rispetto al controllo con acido acetico. Il fatto che nessuna differenza nei livelli delle catechine (altri precursori possibili degli antociani) sia stata rilevata fra i campioni controllo e trattato (Figura 17), suggerisce che il chitosano stimoli selettivamente la sintesi di antociani, senza modificare il profilo generale dell'accumulo degli altri flavonoidi.

I dati precedentemente ottenuti sulle cellule di Barbera (Tassoni *et al.*, 2005), avevano dimostrato che il MeJA inibiva l'espressione della di-idroflavonol-4-reduttasi, un enzima coinvolto nella sintesi dei flavonoidi, mentre induceva preferenzialmente l'espressione delle proteine stilbene sintasi. Di conseguenza, rispetto ai dati precedenti, il chitosano sembra avere un effetto più complesso, stimolando entrambe le vie di biosintesi di stilbeni e flavonoidi, con la risultante produzione di una più ampia gamma di composti antiossidanti (Figura 54).

In risposta al trattamento con chitosano, diversi spots proteici sono stati identificati come proteine pathogenesis-related 10 (PR-10), in particolare 11 negli estratti totali (Figura 19 e Tabella 1), 6 nelle frazioni di proteine solubili (Figura 24 e Tabella 2), 3 nelle frazioni di proteine di membrana (Figura 25 e Tabella 3). Le PR-10 sono una vasta famiglia di proteine, costitutivamente espresse in molte specie di piante, la cui espressione può essere ulteriormente indotta da vari tipi di stress, suggerendo un ruolo generale come proteine di difesa. La loro funzione biologica esatta è ancora sconosciuta, ma recentemente è stata dimostrata l'attività ribonucleasica di tipo II delle PR-10 di *Astragalus mongholicus* (Yan *et*

*al.*, 2008). In particolare, nella vite la loro espressione è indotta dall'infezione da agenti patogeni (Kortekamp, 2006), dagli erbicidi (Castro *et al.*, 2005) e dal MeJA (Tassoni *et al.*, 2005). Queste proteine sono codificate da una famiglia multigenica (van Loon e van Strien, 1999), quindi la presenza di più trascritti (Figura 22) e di numerosi spots di proteine aventi diversi pesi molecolari (Figura 19 e Tabella 1, spots 29-39; Figura 24 e Tabella 2, spots 17 e 43-47; Figura 25 e Tabella 3, spots 51, 57-58), sembra essere in accordo, anche se l'esistenza di varianti alleliche non può essere esclusa (Swoboda *et al.*, 1995). Uno studio sulla PR-10c di betulla ha indicato che questa proteina subisce modificazioni post-traduzionali (Koistinen *et al.*, 2002), lasciando pensare che alcuni degli spots rilevati nelle analisi proteomiche qui presentate possano corrispondere a polipeptidi diversamente processati.



**Figura 54.** Effetti sulla via metabolica dei fenilpropanoidi del trattamento con chitosano 50 µg/mL in sospensioni cellulari di *Vitis vinifera* (cv. Barbera), in accordo coi risultati ottenuti dalle analisi proteomiche di estratti proteici totali.

Nel modello sperimentale qui utilizzato, il chitosano ha indotto meccanismi di difesa, quali accumulo di stilbeni e proteine PR-10, ma non sembra stimolare il processo di lignificazione della parete cellulare, che genera una barriera fisica impedendo la penetrazione e la diffusione dell'agente patogeno, come invece è stato osservato in altri

sistemi vegetali. Infatti, in semi di frumento (Bhaskara Reddy *et al.*, 1999), in sospensioni di cellule e germogli di riso (Lin *et al.*, 2005) e in sospensioni cellulari di *Catharanthus roseus* (Kauss *et al.*, 1989), ad esempio, il trattamento con chitosano induce uno spettro di risposte di difesa fra cui l'accumulo di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, la sintesi dei precursori della lignina e la formazione di callosio. La lignificazione è normalmente accompagnata da una produzione di perossido di idrogeno, che è un substrato, insieme agli acidi cinnamici, della perossidasi di classe III che catalizza l'ultimo passaggio della sintesi delle lignine (Figura 54). Nelle sospensioni cellulari di Barbera trattate con chitosano, le analisi HPLC-DAD non hanno mostrato un accumulo degli acidi idrossicinnamici, precursori della lignina, ed inoltre le analisi proteomiche hanno rilevato una diminuzione dell'espressione della perossidasi di classe III e della catalasi (Figura 19 e Tabella 1, spots 2 e 19; Figura 25 e Tabella 3, spots 14-16).

L'induzione dei meccanismi di difesa conduce inevitabilmente le cellule al consumo di considerevoli risorse disponibili, compresi substrati ed energia. È stato suggerito (Lo e Nicholson, 1998) che la repressione di alcune funzioni cellulari primarie si renda necessaria per assicurare un equilibrio metabolico durante la risposta allo stress causato dall'attacco di un agente patogeno. In accordo con questa ipotesi sembrano essere i risultati delle analisi proteomiche che hanno mostrato una generale diminuzione dell'accumulo delle proteine che appartengono a diverse vie del metabolismo primario (Tabelle 1, 2 e 3).

A seguito delle analisi di immunolocalizzazione, la stilbene sintasi (Figura 23), sembra principalmente associata alle membrane intracellulari collegate strettamente al lato citosolico della membrana plasmatica e del tonoplasto, seppure la sua struttura sia quella di una proteina solubile. Questo risultato è a favore dell'ipotesi, sostenuta da molte evidenze sperimentali ma ancora non dimostrata definitivamente (Hrazdina *et al.*, 1987; Burbulis e Winkel-Shirley, 1999; Winkel-Shirley, 2001a), che gli enzimi di biosintesi e metabolismo dei fenilpropanoidi siano strutturati in complessi multienzimatici associati al reticolo endoplasmatico rugoso, per facilitare il "channeling", cioè il trasferimento degli intermedi. Questa ipotesi è stata formulata e parzialmente dimostrata per la via biosintetica dei flavonoidi (Hrazdina *et al.*, 1987; Burbulis e Winkel-Shirley, 1999), ma dato che i primi enzimi sono in comune, si potrebbe ipotizzare la formazione di un analogo complesso multienzimatico anche per la sintesi degli stilbeni.

I risultati delle analisi proteomiche su frazioni subcellulari non portano ulteriori prove a sostegno dell'ipotesi del complesso biosintetico multienzimatico, ma nemmeno lo

escludono. Sono stati, infatti identificati 7 spots di stilbene sintasi, di cui 4 in frazioni microsomiali (Figura 25 e Tabella 3, spots 23-26) e 3 solubili (Figura 24 e Tabella 2, spots 3 e 21-22). Questi 7, probabilmente, non sono tutti gli spot di STS presenti nei gel, ma sono solo quelli il cui accumulo è variato in seguito al trattamento con chitosano. Inoltre, poiché non sono state riscontrate variazioni di altri enzimi appartenenti alla stessa via metabolica, non è stato possibile stabilire in quale frazione siano maggiormente localizzati. Non è quindi possibile formulare ipotesi più precise sulla eventuale colocalizzazione delle proteine coinvolte e sull'eventuale formazione di un complesso multienzimatico.

A seguito dell'attacco da parte di un patogeno, o del trattamento con chitosano, gli stilbeni non solo vengono prodotti in maggior quantità, ma cambiano anche localizzazione, cioè anziché essere accumulati all'interno della cellula molto probabilmente nel vacuolo, ne viene stimolato il rilascio. Si può, quindi, supporre un'interazione della STS, appartenente o meno ad un complesso multiproteico, con un trasportatore di membrana responsabile del rilascio di questi composti. I trasporti transmembrana di metaboliti secondari possono essere classificati in due grandi tipologie: trasporti primari che utilizzano l'energia liberata dall'idrolisi dell'ATP e trasporti secondari che sfruttano il gradiente di  $H^+$  generato da pompe protoniche. I primi sono regolati da trasportatori ABC (ATP-binding cassette), mentre gli altri sono mediati da proteine di membrana di vario genere, fra cui la famiglia dei MATE (multidrug and toxic compound extrusion) recentemente scoperta (Yazaki, 2005; Yazaki, 2006).

I candidati adatti al rilascio degli stilbeni potrebbero essere dei trasportatori ABC, spesso implicati nei fenomeni di resistenza. Infatti, i risultati preliminari ottenuti dalle analisi proteomiche su frazioni di proteine di membrana sembrano essere a sostegno di questa ipotesi, già dimostrata per i flavonoidi (Yazaki, 2005; Yazaki, 2006), in quanto sono state identificate una ATPasi associata alla membrana plasmatica espressa solamente nelle cellule trattate con chitosano (Figura 25 e Tabella 3, spot 2) ed una subunità di una ATP sintasi vacuolare il cui accumulo, invece, cresce in risposta all'acido acetico e diminuisce in presenza di chitosano (Figura 25 e Tabella 3, spot 28). Questi dati sembrano indicare che in presenza di chitosano gli stilbeni, invece che essere accumulati nel vacuolo, vengano preferenzialmente rilasciati, al fine di aumentare le difese contro il patogeno. Altre evidenze sperimentali presenti in letteratura concordano con questa ipotesi. La complementazione dei mutanti di *S. cerevisiae* con i geni del trasportatore ABC del fungo *M. gramicola* ha indicato che queste proteine possono assicurare la protezione e la

disintossicazione delle cellule nei confronti di parecchi composti, fra cui il resveratrolo (Zweirs *et al.*, 2003). Inoltre, è stato dimostrato che *Botrytis cinerea*, un fungo patogeno della vite che stimola fortemente la produzione di stilbeni, codifica almeno un trasportatore ABC la cui espressione è indotta dal resveratrolo (Yazaki, 2006).

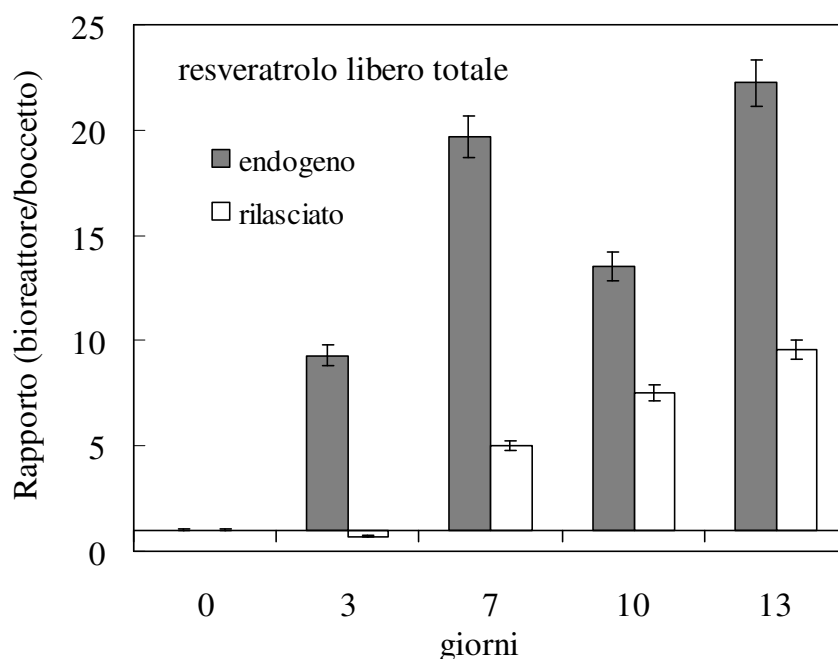
Altri possibili candidati al ruolo di trasportatori degli stilbeni, eventualmente associati alla STS, potrebbero essere i MATE, con un meccanismo di trasporto che trae energia dal gradiente protonico. Il tipo di zucchero coniugato alla molecola da traslocare, compresi i polifenoli, sembra essere più importante dell'aglicone nel determinare il riconoscimento specifico da parte del trasportatore. Le molecole glicosilate sono preferenzialmente traslocate da cotrasportatori protonici, come i MATE, mentre i trasportatori ABC sono più specifici per le forme coniugate con glutathione (Yazaki, 2005). Sono state osservate, però, numerose eccezioni, soprattutto di composti glucosilati traslocati da trasportatori ABC (Yazaki, 2005).

## **2. COLTURE CELLULARI DI VITE IN BIOREATTORE**

I composti polifenolici analizzati in questa Tesi, stilbeni, flavonoidi ed acidi idrossicinnamici, hanno tutti proprietà antiossidanti e vari effetti benefici sia per le piante stesse che per gli animali che se ne cibano, compreso l'uomo (Lin e Tsai, 1999; Frémont, 2000; Gallaher *et al.*, 2002; Soleas *et al.*, 2002; Iriti e Faoro, 2004; Baur *et al.*, 2006; King *et al.*, 2006). Queste molecole sono quindi di grande interesse agronomico ed industriale, perciò, parallelamente agli studi molecolari e metabolici sinora discussi a proposito degli effetti del chitosano in colture cellulari di vite, è stato condotto uno studio con una prospettiva più applicativa.

Le stesse sospensioni cellulari ottenute da picciolo di Barbera sono state utilizzate come inoculo per bioreattori da un litro, allo scopo di studiare l'effetto del passaggio di scala e di ottimizzare le condizioni per la produzione di stilbeni e di altri polifenoli, successivamente anche tramite stimolazione con chitosano. Le colture in fermentatore hanno mostrato di crescere bene e di sintetizzare resveratrolo in quantità molto maggiore rispetto quelle nei boccetti (Figura 28) quando cresciute in condizioni analoghe. In particolare al terreno di coltura sia dei boccetti che del bioreattore è stata addizionata rifampicina 25 µg/mL (sempre utilizzata nelle fermentazioni successive) necessaria per prevenire la crescita di batteri e che aveva dimostrato in precedenza di essere un elicitore del resveratrolo (Ferri *et al.*, 2007). Questa forte stimolazione dovuta al passaggio di scala è ancora più chiara se si

considera la distribuzione del resveratrolo libero totale (somma degli isomeri *trans* e *cis*) fra terreno e contenuto endogeno delle cellule durante tutto il periodo di osservazione. Dal rapporto fra i livelli endogeni e rilasciati in bioreattore ed in bocchetto appare evidente come, nel bioreattore, l'accumulo intracellulare sia superiore di oltre 22 volte ed il rilascio di 10 volte al giorno 13 di coltura (Figura 55).



**Figura 55.** Rapporto dei livelli del resveratrolo libero totale (somma degli isomeri *trans* e *cis*), calcolato normalizzando la quantità totale presente nella coltura in bioreattore F1 con la quantità delle rispettive colture controllo in bocchetto (Figura 15).

L'ottimizzazione delle condizioni di fermentazione ha evidenziato come ognuno dei parametri considerati (concentrazione iniziale di saccarosio nel terreno, tempo di permanenza in bioreattore, trattamento con chitosano, concentrazione dell'inoculo cellulare) abbia una influenza molto marcata sull'andamento della coltura e soprattutto sulla produzione (accumulo intracellulare e rilascio) di numerosi composti polifenolici.

In generale, le colture in bioreattore mantengono una vitalità cellulare superiore all'80 %, anche se un valore così alto è dovuto anche al fatto che le cellule morte, essendo più fragili, vengono rotte dall'agitazione di tipo meccanico (elica marina). Normalmente si osserva una diminuzione del peso fresco durante le prime ore di fermentazione e contemporaneamente si assiste alla formazione di uno strato di cellule aggregate sulla superficie del brodo colturale. Dopo 3-4 giorni il valore del peso fresco comincia a crescere, ma il TMD (tempo medio di duplicazione della biomassa) varia a seconda delle condizioni di coltura, tanto che a volte è risultato essere superiore alla durata della fermentazione (14 giorni). La crescita maggiore e più rapida è stata ottenuta in F2b (TMD di 8,7 giorni) (Figura 28), cioè dopo

che la coltura è stata di nuovo alimentata in fermentatore con terreno fresco al quattordicesimo giorno. Il contenuto saccaridico del terreno non ha mostrato grande influenza sulla crescita cellulare (Figura 28): un peso fresco leggermente superiore è stato ottenuto alimentando la coltura con 30 g/L di saccarosio piuttosto che con una concentrazione 10 g/L, contrariamente a quanto noto dalla letteratura (Decendit e Mérillon, 1996). Anche la concentrazione cellulare dell'inoculo iniziale è risultata importante ai fini della crescita di biomassa (Figura 30) anche se ha avuto effetti molto più evidenti sulla biosintesi dei fenilpropanoidi.

Per quel che riguarda la produzione dei composti polifenolici analizzati, in generale quelli maggiormente prodotti sono stati gli stilbeni, soprattutto *trans*-resveratrolo e *cis*-resveratroloside. Stilbeni, catechine e in misura minore naringenina, sono le molecole che hanno mostrato le variazioni maggiori in risposta alla modifica dei parametri di coltura, mentre gli acidi idrossicinnamici sono stati sempre assenti o presenti in tracce.

Gli effetti maggiori di una concentrazione più alta (30 g/L) di saccarosio nel terreno sono consistiti nel aumentare il rilascio prima di *cis* e poi di *trans*-resveratrolo (Figura 30), di *cis*-resveratroloside (Figura 31), di naringenina (Figura 32) e delle catechine (Figura 33). Al contrario, con una concentrazione di zucchero di 10 g/L vengono soprattutto stimolati *trans*-resveratrolo ed EGCG endogeni.

Il tempo di permanenza della coltura in bioreattore, cioè il fatto di non fermare la fermentazione al termine di un ciclo di due settimane ma di alimentarla con terreno fresco e mantenerla per un ciclo successivo, sembra avere grande importanza nel determinare la gamma ed i livelli dei polifenoli sintetizzati. In seguito all'aggiunta di terreno fresco si è osservato un picco di rilascio del *trans*-resveratrolo circa 5000 volte maggiore (fermentazione F2b) del livello raggiunto al giorno 1 del primo ciclo di coltura (F2a) (Figura 35). Sono aumentati anche i valori di rilascio di *trans*-resveratroloside e *trans*-piceide (Figure 36 e 37), e sono diminuite le forme *cis*, sia di resveratrolo in forma libera che glucosilato (Figure 35, 36 e 37). Durante la seconda settimana di coltura (F2b), la catechina endogena e rilasciata ed l'EGCG rilasciata sono aumentati notevolmente, mentre sono diminuiti l'accumulo di EGCG ed il rilascio di epicatechina (Figura 38).

Il chitosano 50 µg/mL aggiunto ai terreni di coltura rispettivamente contenenti 10 g/L e 30 g/L di saccarosio (fermentazioni F2c e F4) genera effetti differenti sulla produzione di polifenoli, mentre alla concentrazione di 100 µg/mL è tossico per le cellule (Figura 52), provocandone la morte nel giro di 2 giorni. Una elicitazione 5-10 volte maggiore da parte del chitosano è stata rilevata per tutti i composti in presenza della concentrazione di



zucchero più elevata, con l'eccezione della sola EGCG (Figure 40, 41, 42, 43 e 44). In presenza di chitosano (F2c), resveratrolo, resveratroloside e piceide sono aumentati mediamente di 3-5 volte rispetto alle fermentazioni non trattate (F2a e F3), in terreno contenente 30 g/L di saccarosio (Figure 30, 31, 44 e 45). Naringenina e catechine, invece, sono diminuite in presenza di chitosano (Figure 32, 33, 43 e 44), forse a causa dell'utilizzo di una quantità più elevata di substrati per la biosintesi di resveratrolo piuttosto che di calcone. Il chitosano, inoltre ha stimolato in modo particolare il rilascio degli stilbeni (il 60-90 % delle quantità totali presenti nella coltura F2c sono nel terreno), più che il loro accumulo intracellulare, confermando anche in bioreattore quanto già visto in colture in bocchetto (Figura 14) e mimando la risposta all'attacco di un patogeno. Questo è un ulteriore dato che concorda con le osservazioni della alterata permeabilità della membrana plasmatica ad opera del chitosano. Nella stessa direzione conduce l'analisi degli zuccheri presenti nel terreno e all'interno delle cellule eseguita sulle fermentazioni con diverso contenuto di saccarosio, trattate con chitosano e non. Si è osservato, infatti, come in presenza dell'elicatore siano molto più lente l'internalizzazione del saccarosio e la mobilitazione del glucosio (Figure 29 e 39), facendo ipotizzare che il legame del chitosano al lato esterno della cellula impedisca "fisicamente" l'ingresso degli zuccheri oppure agisca alterando le cariche e la permeabilità della membrana plasmatica.

La concentrazione iniziale delle cellule utilizzate per inoculare il bioreattore si è rivelata molto importante nella determinazione qualitativa del tipo di polifenoli prodotti. Le fermentazioni F5 ed F6 sono state inoculate con concentrazioni opposte, vicine ai limiti superiore ed inferiore di fattibilità, per esasperare gli effetti. Dai risultati ottenuti si evince che un'alta concentrazione di cellule (66,3 g/L) inibisce la produzione di stilbeni e catechine (Figure 46, 47, 48, 49 e 50), mentre induce una produzione massiva di calcone (Figura 51). È quindi possibile che vi sia una soglia di concentrazione delle cellule sopra la quale vengono attuati meccanismi di controllo della via biosintetica dei fenilpropanoidi, indirizzando gli intermedi verso l'enzima CHS (che è costitutivamente attivo e catalizza la formazione del calcone) ed inibendo la CHI (che isomerizza il calcone a naringenina). La diminuzione della concentrazione iniziale di cellule in coltura ed il relativo aumento della produzione di catechine ed altri composti affini, erano già stati osservati in sospensioni cellulari di vite in piccola scala (Decendit e Mérillon, 1996), ma senza valutare la possibilità che vi fosse un effetto di soglia dovuto alla biomassa iniziale. Nello stesso studio era stato dimostrato che una diminuzione del saccarosio nel terreno stimola la crescita delle cellule. Dalle analisi eseguite per questa Tesi, invece, risulta che la concentrazione di

zucchero nel terreno ha un effetto limitato sull'aumento di biomassa, anche se in presenza di una maggiore concentrazione di saccarosio le colture crescono in maniera leggermente più veloce.

In letteratura sono riportati pochissimi studi su colture cellulari di vite in bioreattore. Il gruppo di J.M. Mérillon ha pubblicato il primo articolo sull'argomento alla fine degli anni '90 (Decendit *et al.*, 1996) in cui si valutava la produzione di antocianine, catechine, tannini condensati e piceide in colture di Gamay Fréaux (*Vitis vinifera* L.) in un volume di 20 L. La crescita e la produzione dei composti analizzati si erano rivelati inferiori rispetto alle colture cresciute in beuta. Nel 2003 lo stesso gruppo di ricerca ha pubblicato un secondo articolo (Aumont *et al.*, 2004) in cui, ottimizzando alcuni parametri di coltura, avevano ottenuto in fermentatori da 2 L rese analoghe a quelle delle beute.

I risultati presentati in questa Tesi provano come la produzione di polifenoli in colture cellulari di vite cresciute in bioreattore possa abbondantemente superare quella ottenuta in piccola scala. Questo risultato, migliore rispetto a quelli presenti in letteratura, può essere dovuto all'utilizzo di una cultivar di vite diversa, ma anche all'ulteriore ottimizzazione dei parametri di coltura. Dall'agitazione con eliche a turbina si è passati all'uso di un'elica marina, rendendo la coltura più omogenea e sottoponendo le cellule ad un minore stress da taglio. L'aerazione è stata mantenuta in eccesso e non si è rivelata un fattore limitante per la crescita o dannoso per la stabilità dei prodotti. Il terreno è stato ottimizzato per alcune sue componenti ed è stato utilizzato un antibiotico (rifampicina 25 µg/mL) per prevenire inquinamenti batterici che però si è dimostrato avere anche un certo effetto elicitorio (Ferri *et al.*, 2007). Inoltre l'aggiunta di 50 µg/mL chitosano ha stimolato la produzione ed il rilascio dei polifenoli d'interesse.

Il lavoro di messa a punto delle fermentazioni finora svolto conduce alla conclusione che, almeno per quel che riguarda le cellule di vite cv. Barbera, non esistono condizioni di coltura ottimali univoche per massimizzare la contemporanea produzione di tutti i polifenoli di interesse, ma al contrario, modulando i diversi parametri, potrebbe essere possibile orientare la produzione verso una specifica categoria di composti. Ad esempio per una migliore resa di catechine occorre aumentare la concentrazione di saccarosio nel terreno e prolungare il tempo di coltura, ma va evitata l'aggiunta di chitosano.

Invece, per quanto riguarda gli stilbeni, la resa migliore, fra tutte le condizioni di coltura saggiate, è stata ottenuta con la fermentazione F2c. In questo caso la coltura era in bioreattore già da un mese, alimentata ogni 14 giorni con terreno fresco contenente 30 g/L di saccarosio e 25 µg/mL di rifampicina, mantenuta a 24°C, resa omogenea tramite

agitazione con un'elica marina alla velocità di 100 rpm, areata attraverso insufflazione di aria sterile a 0,16 L/min. Negli 800 mL di coltura al giorno 0 di F2c erano presenti 10,8 grammi di peso fresco cellulare (cioè 13,5 gFW/L) e la coltura è stata trattata con 50 µg/mL di chitosano. Al quarto giorno di coltura dopo l'aggiunta dell'elicitore, giorno di massima produzione di resveratrolo e piceide, sono stati quantificati nella coltura 3,95 mg/L di stilbeni (0,99 mg/L di resveratrolo, 0,12 mg/L di piceide e 2,85 mg/L di resveratroloside), di cui l'80 % rilasciati nel terreno. Al giorno 14, giorno di massima produzione di resveratroloside, ne sono stati quantificati 5,13 mg/L (0,82 mg/L di resveratrolo, 0,06 mg/L di piceide e 4,24 mg/L di resveratroloside), di cui quasi l'87 % presenti nel terreno. Da questi valori totali sono ovviamente esclusi tutti gli altri stilbeni che potrebbero essere presenti nella coltura ma che non sono stati analizzati, come *trans* e *cis*-astringina, diglucosilati e viniferine. Il fatto che la presenza di chitosano aumenti il rilascio degli stilbeni, facilita il recupero e la purificazione di questi prodotti, soprattutto nel caso in cui si intendesse condurre una fermentazione in continuo con riciclo di biomassa, cioè in cui tutto o parte del terreno venisse periodicamente rimossa e sostituita da terreno fresco. Se questa operazione fosse eseguita ogni 4 giorni (nelle condizioni di coltura sopra indicate, in un mese (28 giorni) si potrebbero ipoteticamente purificare dal terreno fino a 22 mg/L di stilbeni, mentre se fosse eseguita ogni 14, oltre 10 mg/L.

Recenti studi su modelli animali hanno dimostrato che il resveratrolo, somministrato per via orale in dosi giornaliere di 5-22 mg/Kg a topi sottoposti ad una dieta ipercalorica, migliora qualità e aspettativa di vita (Baur *et al.*, 2006). Dosi nell'ordine di grandezza dei mg/Kg di peso corporeo sono potenzialmente somministrabili anche all'uomo. Per sostenere la richiesta di quantità di resveratrolo utili per trattamenti di tale entità, occorrerebbero ulteriori passaggi di scala fino all'uso di bioreattori molto grandi. Produzioni più modeste potrebbero essere sufficienti per applicazioni in campo alimentare (ad esempio per integratori) o cosmetico. Bisogna però considerare anche che, nell'esperimento condotto da Baur e collaboratori (2006), ai topi è stato somministrato solo il resveratrolo in forma libera. Dalla letteratura è noto che anche altri stilbeni hanno effetti benefici paragonabili al resveratrolo ed in particolare, è stato dimostrato che i derivati glucosilati (come piceide e resveratroloside) sono più stabili, maggiormente resistenti alla degradazione da parte dei succhi gastrici e della flora batterica dell'apparato gastrointestinale e facilmente assorbiti dall'uomo a livello della mucosa (Regev-Shoshani *et al.*, 2003). Il primo passaggio del loro assorbimento intestinale è la deglucosilazione ad opera di specifiche  $\beta$ -glucosilasi, perciò in tutti i successivi passaggi di assorbimento,

metabolizzazione ed azione, gli agliconi derivati dai glucosilati sono parimenti efficaci al resveratrolo somministrato in forma libera con un notevole aumento della biodisponibilità di questa molecola (Kuhnle *et al.*, 2000; Aumont *et al.*, 2001; Walle *et al.*, 2004; Henry-Vitrac *et al.*, 2006; King *et al.*, 2006). Perciò, a parità di effetto biologico desiderato, l'utilizzo di piceide e resveratroloside in sostituzione od in aggiunta alla somministrazione di resveratrolo, potrebbe permettere la somministrazione di dosi inferiori di stilbeni. In quest'ottica, il fatto che, nella coltura in bioreattore stimolata con chitosano, il resveratroloside rappresenti la maggioranza degli stilbeni prodotti (il 61,2 % al giorno 4 ed il 74,3 % al giorno 14) può essere considerato un ulteriore vantaggio da un punto di vista produttivo.

# **CONCLUSIONI**

In conclusione, l'effetto del chitosano nell'induzione dei meccanismi di difesa in *Vitis vinifera* può essere collegato con la sua capacità di aumentare il contenuto intracellulare di una ampia gamma di antiossidanti, ed in particolare di resveratrolo, suoi derivati ed antociani. Questo elicitore sembra esercitare un effetto abbastanza complesso, evidenziabile a livello trascrizionale (variazioni nell'accumulo di diversi mRNA), proteomico (aumento o diminuzione della quantità di numerose proteine) e metabolico (stimolazione o inibizione della produzione di composti antiossidanti). Tuttavia il chitosano non influenza solo le vie di biosintesi di stilbeni e flavonoidi, ma influenza anche altri meccanismi di difesa e diversi metabolismi primari. Infatti, mima l'attacco da fungo patogeno a cui la cellula vegetale reagisce con la produzione di stilbeni e proteine PR-10, ma allo stesso tempo esercita un effetto anche sui metabolismi primari allo scopo di conservare l'equilibrio di risorse interne (energie e substrati). Fra le reazioni di difesa indotte dal chitosano nelle colture di vite cv. Barbera non vi è, tuttavia, la lignificazione della parete cellulare.

L'azione stimolatrice del chitosano, comunque, sembra essere selettiva per determinati composti. Ad esempio stimola la sintesi di antociani senza però aumentare i livelli di catechine (che rientrano fra i loro precursori) e senza modificare il profilo generale dell'accumulo degli altri flavonoidi.

L'elicitazione da parte del chitosano è amplificata dal passaggio di scala. In bioreattore si osservano stimolazioni maggiori soprattutto del resveratroloside, uno stilbene monoglucosilato. Al contrario viene ridotta la sintesi di catechine, mentre sembra non influire particolarmente sulla produzione di altri flavonoidi e di acidi idrossicinnamici.

Stilbeni, flavonoidi ed acidi idrossicinnamici, i composti polifenolici analizzati in questa Tesi, posseggono proprietà antiossidanti e generano vari effetti benefici nelle piante che li producono e negli animali che se ne cibano, incluso l'uomo. Sono quindi molecole di interesse agronomico ma possono anche interessare l'industria farmaceutica, alimentare e cosmetica. Alla luce dei risultati ottenuti in questa Tesi, la produzione di queste molecole in scala pre-industriale sembra realizzabile. Inoltre, dal lavoro di ottimizzazione delle condizioni di coltura in bioreattore, sembrerebbe possibile orientare la produzione verso una specifica categoria di composti semplicemente modulando parametri colturali, quali il contenuto di saccarosio del terreno, la durata della fermentazione, la concentrazione cellulare dell'inoculo e l'assenza o la presenza di elicitori.



# **BIBLIOGRAFIA**

- Adrian M, Jeandet P, Bessis R, Jun WJ** (1996) Induction of phytoalexin (resveratrol) synthesis in grapevine leaves treated with aluminium chloride ( $\text{AlCl}_3$ ). *J Agric Food Chem* **44**: 1979-1981.
- Adrian M, Jeandet P, Douillet-Breuil AC, Tesson L, Bessis R** (2000). Stilbene content of mature *Vitis vinifera* berries in response to UV-C elicitation. *J Agric Food Chem* **48**: 6103-6105.
- Ait Barka E, Eullaffroy P, Clément C, Vernet G** (2004) Chitosan improves development, and protects *Vitis vinifera* L. against *Botrytis cinerea*. *Plant Cell Rep* **22**: 608-614.
- Aumont V, Krisa S, Battaglia E, Netter P, Richard T, Mérillon JM, Magdalaou J, Sabolovic N** (2001) Regioselective and stereospecific glucuronidation of *trans*- and *cis*-resveratrol in human. *Arch Biochem Biophys* **393**: 281-289.
- Aumont V, Larronde F, Richard T, Budzinski H, Decendit A, Deffieux G, Krisa S, Mérillon JM** (2004) Production of highly  $^{13}\text{C}$ -labeled polyphenols in *Vitis vinifera* cell bioreactor cultures. *J Biotech* **109**: 287-294.
- Austin MB, Bowman ME, Ferrer JL, Schröder J, Noel JP** (2004) An aldol switch discovered in stilbene synthase mediates cyclization specificity of type III polyketide synthases. *Chem Biol* **11**: 1179-1194.
- Bantignies B, Séguin J, Muzac I, Dédaldéchamp F, Gulick P, Ibrahim R** (2000) Direct evidence for ribonucleolytic activity of a PR-10-like protein from white lupin roots. *Plant Mol Biol* **42**: 871-881.
- Baur JA, Pearson KJ, Price NL, Jamieson HA, Lerin C, Kalra A, Prabhu VV, Allard JS, Lopez-Lluch G, Lewis K, Pistell PJ, Poosala S, Becker KG, Boss O, Gwinn D, Wang M, Ramaswamy S, Fishbein KW, Spencer RG, Lakatta EG, Le Couteur D, Shaw RJ, Navas P, Puigserver P, Ingram DK, de Cabo R, Sinclair DA** (2006) Resveratrol improves health and survival of mice on a high-calorie diet. *Nature* **444**: 337-342.
- Bavaresco L, Goncalves MI, Vezzulli S** (2006) Ruolo dei fattori viticoli sugli stilbeni in uva e vino. *L'informatore Agrario* **35**: 67-70.

- Bavaresco L, Vezzulli S, Battilani P, Giorni P, Pietri A, Bertuzzi T** (2003) Effect of ochratoxin A-producing *Aspergilli* on stilbenic phytoalexin synthesis in grapes. *J Agric Food Chem* **51**: 6151-6157.
- Bézier A, Lambert B, Baillieul F** (2002) Study of defense-related gene expression in grapevine leaves and berries infected with *Botrytis cinerea*. *Eur J Plant Pathol* **108**: 111-120.
- Bhaskara Reddy MV, Arul J, Angers P, Couture L** (1999) Chitosan treatment of wheat seeds induces resistance to *Fusarium graminearum* and improves seed quality. *J Agric Food Chem* **47**: 1208-1216.
- Bourgaud F, Gravot A, Milesi S, Gontier E** (2001) Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. *Plant Science* **161**: 839-851.
- Bradford MM** (1976) A rapid and sensitive for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**: 248-254.
- Burbulis IE, Winkel-Shirley B** (1999) Interactions among enzymes of the *Arabidopsis* flavonoid biosynthetic pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**: 12929-12934.
- Castro AJ, Carapito C, Zorn N, Magne C, Leize E, Van Dorsselaer A, Clement C** (2005) Proteomic analysis of grapevine (*Vitis vinifera* L.) tissues subjected to herbicide stress. *J Exp Bot* **56**: 2783-2795.
- Chang S, Puryear J, Cairney J** (1993) A simple and efficient method for isolating RNA from pine trees. *Plant Mol Rep* **11**: 113-116.
- Commun K, Mauro MC, Chupeau Y, Boulay M, Burrus M, Jeandet P** (2003) Phytoalexin production in grapevine protoplasts during isolation and culture. *Plant Physiol Biochem* **41**: 317-323.
- Coutos-Thévenot P, Poinssot B, Bonomelli A, Yean H, Breda C, Buffard D, Esnault R, Hain R, Boulay M** (2001) *In vitro* tolerance to *Botrytis cinerea* of grapevine 41B rootstock in transgenic plants expressing the stilbene synthase *Vst1* gene under the control of a pathogen-inducible PR 10 promoter. *J Exp Bot* **52**: 901-910.
- Darvill AG, Albersheim P** (1984). Phytoalexins and their elicitor – a defense against microbial infection in plants. *Ann Rev Plant Physiol* **35**: 243-275.
- Darzynkiewicz Z, Li X, Gong J** (1994) Assay of cell viability: discrimination of cells dying by apoptosis. In: Darzynkiewicz Z, Robinson JP, Crissman HA; eds. *Methods in Cell Biology*; San Diego, CA, USA: Academic Press Inc, **41**: 15-38.
- Decendit A, Mérillion JM** (1996) Condensed tannin and anthocyanin production in *Vitis vinifera* cell suspension cultures. *Plant Cell Rep* **15**: 762-765.



- Decendit A, Ramawat KG, Waffo Teguo P, Deffieux G, Badoc A, Mérillon JM** (1996) Anthocyanins, catechins, condensed tannins and piceid production in *Vitis vinifera* cell bioreactor cultures. *Biotechnol Lett* **18**: 659-662.
- Decendit A, Waffo Teguo P, Richard T, Krisa S, Vercauteren J, Monti JP, Deffieux G, Mérillon JM** (2002) Galloylated catechins and stilbene diglucosides in *Vitis vinifera* cell suspension cultures. *Phytochemistry* **60**: 795-798.
- Dixon RA, Xie dY, Sharma SB** (2005) Proanthocyanidinins – a final frontier in flavonoid research? *New Phytol* **165**: 9-28.
- Dörnenburg H., Knorr D** (1995) Strategies for the improvement of secondary metabolite production in plant cell cultures. *Enz Microb Technol* **17**: 674-684.
- Faoro F, Iriti M** (2007) Callose synthesis as a tool to screen chitosan efficacy in inducing plant resistance to pathogens. *Caryologia* **60**: 121-124.
- Ferrer JL, Jez JM, Bowman ME, Dixon RA, Noel JP** (1999). Structure of chalcone synthase and the molecular basis of plant polyketide biosynthesis. *Nat Struct Biol* **6**: 775-784.
- Ferri M** (2005) Produzione di resveratrolo in colture cellulari di vite. Un approccio biotecnologico per l'ottenimento di resveratrolo, molecola di grande interesse farmaceutico e cosmetico. *Prometeus (ANBI Magazine)* **6**: 7-8.
- Ferri M, D'Errico AL, Vacchi Suzzi M, Franceschetti M, Righetti L, Bagni N, Tassoni A** (2007) Use of rifampicin for resveratrol production in *Vitis vinifera* cell suspensions. In P Jeandet, C Clément, A Conreux, eds, *Macromolecules and secondary metabolites of grapevine and wine*. Lavoisier, Paris, pp 95-98.
- Ferri M, Tassoni A, Righetti L, Franceschetti M, Bagni N** (2008) Produzione di resveratrolo in colture cellulari di vite. In: Bacchiocca M, Bordoni A, Dalla Rosa M, S G; *Antiossidanti naturali: metodi di analisi, biodisponibilità ed effetti in-vivo*; in stampa.
- Franceschetti M, Tassoni A, Musiani F, Ferri M, Fornalè S, Fornara V, Citterio S, Sgorbati S, Michael AJ, Bagni N** (2005) Variazione del contenuto di *cis*- e *trans*-resveratrolo in colture cellulari liquide di cellule di vite trattate con diversi elicitori biotici. *Inf Bot It* **37**: 718-719.
- Frémont L** (2000) Biological effects of resveratrol. *Life Sci* **66**: 663-673.
- Gallaher DD, Gallaher CM, Mahrt GJ, Carr TP, Hollingshead CH, Hesslink R Jr, Wise J** (2002) A glucomannan and chitosan fiber supplement decreases plasma cholesterol and increases cholesterol excretion in overweight normocholesterolemic human. *J Am Coll Nutr* **21**: 428-433.

- Gamborg OL, Miller RA, Ojima K** (1968) Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp Cell Res* **50**: 151-158.
- Gambutì A, Strollo D, Ugliano M, Lecce L, Moio L** (2004) *trans*-Resveratrol, quercetin, (+)-catechin, and (-)-epicatechin content in south Italian monovarietal wines: relationship with maceration time and marc pressing during winemaking. *J Agric Food Chem* **52**: 5747-5751.
- Giorcelli A, Sparvoli F, Mattivi F, Tava A, Balestrazzi A, Vrhovsek U, Calligari P, Bollini R, Confalonieri M** (2004) Expression of the stilbene synthase (StSy) gene from grapevine in transgenic white poplar results in high accumulation of the antioxidant resveratrol glucosides. *Trans Res* **13**: 203-214.
- Goldberg DM, Ng E, Karumanchiri A, Yan J, Diamandis EP, Soleas GJ** (1995) Assay of resveratrol glucosides and isomers in wine by direct-injection high-performance liquid chromatography. *J Chromatog* **708**: 89-98.
- Goodwin PH, Hsiang T, Erickson L** (2000). A comparison of stilbene and chalcone synthases including a new stilbene synthase gene from *Vitis riparia* cv. Gloire de Montpellier. *Plant Sci* **151**: 1-8.
- Hadwiger LA** (1999) Host-parasite interactions: elicitation of defense responses in plants with chitosan. In P Jolles, RAA Muzzarelli, eds, *Chitin and Chitosanes*. Birkhauser Verlag, Basel, Switzerland, pp 185-200.
- Henry-Vitrac C, Desmoulière A, Girard D, Mérillon JM, Krisa S** (2006) Transport, deglycosylation, and metabolism of *trans*-piceid by small intestinal epithelial cells. *Eur J Nutr* **45**: 376-382.
- Honda H, Hiraoka K, Nagamori E, Omote M, Kato Y, Hiraoka S, Kobayashi T** (2002) Enhanced anthocyanin production from grape callus in an air-lift type bioreactor using a viscous additive-supplemented medium. *J Biosc Bioeng* **94**: 135-139.
- Howitz KT, Bitterman KJ, Cohen HY, Lamming DW, Lavu S, Wood JG, Zipkin RE, Chung P, Kisielewski A, Zhang LL, Scherer B, Sinclair DA** (2003) Small molecule activators of sirtuins extend *Saccharomyces cerevisiae* lifespan. *Nature* **425**: 191-196.
- Hrazdina G, Zobel AM, Hock HC** (1987) Biochemical, immunological, and immunocytochemical evidence for the association of chalcone synthase with endoplasmic reticulum membranes. *Proc Natl Acad Sci USA* **84**: 8966-8970.
- Iriti M, Rabotti G, De Ascensao A, Faoro F** (2003) Benzothiadiazole-induced resistance modulates ozone tolerance. *J Agric Food Chem* **51**: 4308-4314.

- Iriti M, Faoro F** (2004) Plant defence & human nutrition: phenylpropanoids on the menu. *Curr Top Nutr Res* **2**: 47-65.
- Jeandet P, Breuil AC, Adrian M, Weston LA, Debord S, Meunier P, Maume G, Bessis R** (1997) HPLC analysis of grapevine phytoalexins coupling photodiode array detector and fluorimetry. *Anal Chem* **69**: 5172-5177.
- Jeandet P, Douillet-Breuil AC, Bessis R, Debord S, Sbaghi M, Adrian M** (2002) Phytoalexins from the *Vitaceae*: biosynthesis, phytoalexin gene expression in transgenic plants, antifungal activity, and metabolism. *J Agric Food Chem* **50**: 2731-2741.
- Kauss H, Jeblick W, Domard A** (1989) The degrees of polymerization and N-acetylation of chitosan determine its ability to elicit callose formation in suspension cells and protoplasts of *Catharanthus roseus*. *Planta* **178**: 385-392.
- Kieran PM, MacLoughlin PF, Malone DM** (1997) Plant cell suspension cultures: some engineering considerations. *J Biotech* **59**: 39-52.
- Kim HJ, Chen F, Wang X, Rajapakse NC** (2005) Effect of chitosan on the biological properties of sweet basil (*Ocimum basilicum* L.). *J Agric Food Chem* **53**: 3696-3701.
- King RE, Bomser JA, Min DB** (2006) Bioactivity of resveratrol. *Comp Rev Food Sci Food Saf* **5**: 65-70.
- Koistinen KM, Soininen P, Venalainen TA, Hayrinen J, Laatikainen R, Perakyla M, Tervahauta AI, Karenlampi SO** (2005) Birch PR-10c interacts with several biologically important ligands. *Phytochemistry* **66**: 2524-2533.
- Kopp P** (1998) Resveratrol, a phytoestrogen found in red wine. A possible explanation for the conundrum of the 'French paradox'? *Eur J Endocrinol* **138**: 619-620.
- Kortekamp A** (2006) Expression analysis of defence-related genes in grapevine leaves after inoculation with a host and a non-host pathogen. *Plant Physiol Biochem* **44**: 58-67.
- Krisa S, Larronde F, Budzinski H, Decendit A, Deffieux G, Mérillon J** (1999) Stilbene production by *Vitis vinifera* cell suspension cultures: methyljasmonate induction and <sup>13</sup>C biolabeling. *J Nat Prod* **62**: 1688-1690.
- Kuhnle G, Spencer JPE, Chowrimootoo G, Schroeter H, Debnam ES, Srai SKS, Rice-Evans C, Hahn U** (2000). Resveratrol is absorbed in the small intestine as resveratrol glucuronide. *Biochem Biophys Res Commun* **272**: 212-217.
- Lainé E, David H, David A** (1988) Callus formation from cotyledon protoplasts of *Pinus patula*. *Plant Sci* **72**: 374-378.
- Lainé E, David A** (1990) Somatic embryogenesis in immature embryos and protoplasts of *Pinus caribea*. *Plant Sci* **69**: 215-224.

- Landrault N, Poucheret P, Ravel P, Gasc F, Cros G, Teissedre PL** (2001) Antioxidant capacities and phenolics levels of French wines from different varieties and vintages. *J Agric Food Chem* **49**: 3341-3348.
- Langcake P, Pryce RJ** (1976) The production of resveratrol by *Vitis vinifera* and other members of the *Vitaceae* as a response to infection or injury. *Physiol Plant Pathol* **9**: 77-86.
- Lin W, Hu X, Zhang W, Rogers WJ, Cai W** (2005) Hydrogen peroxide mediates defence responses induced by chitosans of different molecular weights in rice. *J Plant Physiol* **162**: 937-944.
- Lin JK, Tsai SH** (1999) Chemoprevention of cancer and cardiovascular disease by resveratrol. *Proc Natl Sci Counc Repub China* **23**: 99-106.
- Lo SCC, Nicholson RL** (1998) Reduction of light-induced anthocyanin accumulation in inoculated sorghum mesocotyls. Implications for a compensatory role in the defense response. *Plant Physiol* **116**: 979-989.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ** (1951) Protein measurement with the Folin-Phenol reagents. *J Biol Chem* **193**: 265-275.
- Majima T, Tojo S, Ishida A, Takamuku S** (1996) *Cis-trans* isomerization and oxidation of radical cations of stilbene derivatives. *J Org Chem* **61**: 7793-7800.
- Melchior F, Kindl H** (1991). Coordinate- and elicitor-dependent expression of stilbene synthase and phenylalanine ammonia-lyase genes in *Vitis* cv. Optima. *Arch Biochem Biophys* **288**: 552-557.
- Monteiro S, Picarra-Pereira MA, Loureiro VB, Teixeira AR, Ferreira RB** (2007) The diversity of pathogenesis-related proteins decreases during grape maturation. *Phytochemistry* **68**: 416-425.
- Moustafa E, Wong E** (1967) Purification and properties of chalcone-flavanone isomerase from soya bean seed. *Phytochem* **6**: 625-632.
- Murashige T, Skoog F** (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* **15**: 473-497.
- Musiani F, Bagni N, Mordenti GL, Franceschetti M, Tassoni A** (2006) Analisi del contenuto di resveratrolo in uve e vini romagnoli. *VQ* **5**: 51-58.
- Nagamori E, Hiraoka K, Honda H, Kobayashi T** (2001) Enhancement of anthocyanin production from grape (*Vitis vinifera*) callus in a viscous additive-supplemented medium. *Biochem Eng J* **9**: 59-65.

- Ndimba BK, Chivasa S, Hamilton JM, Simon WJ, Slabas AR** (2003) Proteomic analysis of changes in the extracellular matrix of *Arabidopsis* cell suspension cultures induced by fungal elicitors. *Proteomics* **3**: 1047-1059.
- Németh K, Plumb GW, Berrin JG, Juge N, Jacob R, Naim HY, Williamson G, Swallow DM, Kroon PA** (2003) Deglycosylation by small intestinal epithelial cell  $\beta$ -glucosidases is a critical step in the absorption and metabolism of dietary flavonoid glycosides in humans. *Eur J Nutr* **42**: 29-42.
- Orallo F** (2006) Comparative studies of the antioxidant effects of *cis*- and *trans*-resveratrol. *Curr Med Chem* **13**: 87-98.
- Orsini F, Pelizzoni F, Verotta L, Aburjai T** (1997) Isolation, synthesis, and antiplatelet aggregation activity of resveratrol 3-O- $\beta$ -D-glucopyranoside and related compounds. *J Nat Prod* **60**: 1082-1087.
- Pervaiz S** (2003) Resveratrol: from grapevine to mammalian biology. *FASEB J* **17**: 1975-1985.
- Pezet R, Perret C, Jean-Denis JB, Tabacchi R, Gindro K, Viret O** (2003) Delta-viniferin, a resveratrol dehydrodimer: one of the major stilbenes synthesized by stressed grapevine leaves. *J Agric Food Chem* **51**: 5488-5492.
- Pfeiffer J, Kuhnel C, Brandt J, Duy D, Punyasiri PA, Forkmann G, Fischer TC** (2006) Biosynthesis of flavan 3-ols by leucoanthocyanidin 4-reductases and anthocyanidin reductases in leaves of grape (*Vitis vinifera* L.), apple (*Malus x domestica* Borkh.) and other crops. *Plant Physiol Biochem* **44**: 323-334.
- Pieterse CMJ, van Loon LC** (1999) Salicylic acid-independent plant defence pathways. *Trends Plant Sci* **4**: 52-58.
- Pinto MP, Ribeiro A, Regalado AP, Rodrigues-Pousada C, Ricardo CPP** (2005) Expression of *Lupinus albus* PR-10 proteins during root and leaf development. *Biol Plant* **49**: 187-193.
- Rabea EI, Badway MET, Stevens C, Smaghe G, Steurbaunt W** (2003) Chitosan as antimicrobial agent: applications and mode of action. *Biomacromolecules* **4**: 1457-1465.
- Regev-Shoshani G, Shiseyov O, Bilkis I, Kerem Z** (2003) Glycosylation of resveratrol protects it from enzymic oxidation. *Biochem J* **374**: 157-163.
- Ribeiro de Lima MT, Waffo Teguo P, Teissedre PL, Pujolas A, Vercauteren J, Cabanis JC, Merillon JM** (1999) Determination of stilbenes (*trans*-astringin, *cis*- and *trans*-piceid, and *cis*- and *trans*-resveratrol) in Portuguese wines. *J Agric Food Chem* **47**: 2666-2670.

- Righetti L, Franceschetti M, Ferri M, Tassoni A, Bagni N** (2007) Resveratrol production in *Vitis vinifera* cell suspension treated with several elicitors. *Caryologia* **60**: 169-171.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T** (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Schenk RU, Hildebrandt AC** (1972) Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures. *Can J Bot* **50**: 199-204.
- Schröder J** (1999). Probing plant polyketide biosynthesis. *Nat Struct Biol* **6**: 714-716.
- Schröder G, Brown JW, Schröder J** (1988). Molecular analysis of resveratrol synthase. cDNA, genomic clones and relationship with chalcone synthase. *Eur J Biochem* **172**: 161-169.
- Schubert R, Fischer R, Hain R, Schreier PH, Bahnweg G, Ernst D, Sandermann H, Jr.** (1997) An ozone-responsive region of the grapevine resveratrol synthase promoter differs from the basal pathogen-responsive sequence. *Plant Mol Biol* **34**: 417-426.
- Serafini-Fracassini D, Del Duca S, Monti F, Poli F, Sacchetti G, Bregoli AM, Biondi S, Della Mea M** (2002) Transglutaminase activity during senescence and programmed cell death in the corolla of tobacco (*Nicotiana tabacum*) flowers. *Cell Death Diff* **9**: 309-321.
- Shomura Y, Torayama I, Suh DY, Xiang T, Kita A, Sankawa U, Miki K** (2005) Crystal structure of stilbene synthase from *Arachis hypogaea*. *Proteins* **60**: 803-806.
- Siemann EH, Creasy LL** (1992) Concentration of the phytoalexin resveratrol in wine. *Am J Enol Vitic* **43**: 49-52.
- Soleas GJ, Diamandis EP, Goldberg DM** (1997) Resveratrol: a molecule whose time has come? And gone? *Clin Biochem* **30**: 91-113.
- Soleas GJ, Grass L, Josephy D, Goldberg DM, Diamandis EP** (2002) A comparison of the anticarcinogenic properties of four red wine polyphenols. *Clin Biochem* **35**: 119-124.
- Sparvoli F, Martin C, Scienza A, Gavazzi G, Tonelli C** (1994) Cloning and molecular analysis of structural genes involved in flavonoid and stilbene biosynthesis in grape (*Vitis vinifera*). *Plant Mol Biol* **24**: 743-755.
- Speicher KD, Kolbas O, Harper S, Speicher DW** (2000) Systematic analysis of peptide recoveries from in-gel digestions for protein identifications in proteome studies. *J Biomol Tech* **11**: 74-86.
- Swoboda I, Scheiner O, Heberle-Bors E, Vicente O** (1995) cDNA cloning and characterization of three genes in the Bet v 1 gene family that encode pathogenesis-related proteins. *Plant Cell Environ* **18**: 865-874.

- Tassoni A, Fornalè S, Franceschetti M, Musiani F, Michael AJ, Perry B, Bagni N** (2005) Jasmonates and Na-orthovanadate promote resveratrol production in *Vitis vinifera* cv. Barbera cell cultures. *New Phytol* **166**: 895-905.
- Valenzano DR, Terzibasi E, Genade T, Cattaneo A, Domenici L, Cellerino A** (2006) Resveratrol prolongs lifespan and retards the onset of age-related markers in a short-lived vertebrate. *Curr Biol* **16**: 296-300.
- van Loon LC, van Strien EA** (1999) The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. *Physiol Mol Plant Patol* **55**: 85-97.
- Versari A, Parpinello GP, Tornielli GB, Ferrarini R, Giulivo C** (2001) Stilbene compounds and stilbene synthase expression during ripening, wilting, and UV treatment in grape cv. Corvina. *J Agric Food Chem* **49**: 5531-5536.
- Waffo Teguo P, Descendit A, Krisa S, Deffieux G, Vercauteren J, Mérillon JM** (1996a) The accumulation of stilbene glycosides in *Vitis vinifera* cell suspension cultures. *J Nat Prod* **59**: 1189-1191.
- Waffo Teguo P, Descendit A, Vercauteren J, Deffieux G, Mérillon JM** (1996b). *Trans-resveratrol-3-O-β-glucoside* (piceid) in cell suspension cultures of *Vitis vinifera*. *Phytochemistry* **42**: 1591-1593.
- Waffo Teguo P, Fauconneau B, Deffieux G, Huguet F, Vercauteren J, Merillon JM** (1998) Isolation, identification, and antioxidant activity of three stilbene glucosides newly extracted from *Vitis vinifera* cell cultures. *J Nat Prod* **61**: 655-657.
- Waffo Teguo P, Lee D, Cuendet M, Merillon J, Pezzuto JM, Kinghorn AD** (2001) Two new stilbene dimer glucosides from grape (*Vitis vinifera*) cell cultures. *J Nat Prod* **64**: 136-138.
- Walle T, Hsieh F, DeLegge MH, Oatis JE Jr, Walle K** (2004) High absorption but very low bioavailability of oral resveratrol in humans. *Drug Metab Disp* **32**:1377-1382.
- Waterhouse AL, Lamuela-Raventos RM** (1994) The occurrence of piceid, a stilbene glucoside, in grape berries. *Phytochemistry* **37** 571-573.
- Whitehead TP, Robinson D, Allaway S, Syms J, Hale A** (1995) Effect of red wine ingestion on the antioxidant capacity of serum. *Clin Chem* **41**: 32-35.
- Wiese W, Vornam B, Krause E, Kindl H** (1994) Structural organization and differential expression of three stilbene synthase genes located on a 13 kb grapevine DNA fragment. *Plant Mol Biol* **26**: 667-677.

- Winkel-Shirley B** (2001a) Flavonoid biosynthesis. A colorful model for genetics, biochemistry, cell biology, and biotechnology. *Plant Physiol* **126**: 485-493.
- Winkel-Shirley B** (2001b) It takes a garden. How work on diverse plant species has contributed to an understanding of flavonoid biosynthesis. *Plant Physiol* **127**: 1399-1404.
- Yan Q, Qi X, Jiang Z, Yang S, Han L** (2008) Characterization of a pathogenesis-related class 10 protein (PR-10) from *Astragalus mongholicus* with ribonuclease activity. *Plant Physiol Biochem* **46**: 93-99.
- Yazaki K** (2005) Transporters of secondary metabolites. *Curr Opin Plant Biol* **8**: 301-307.
- Yazaki K** (2006) ABC transporters involved in the transport of plant secondary metabolites. *FEBS Lett* **580**: 1183-1191.
- Zweirs LH, Stergiopoulos I, Gielkens MMC, Goodal SD, De Waard MA** (2003) ABC transporters of the wheat pathogen *Mycosphaerella graminicola* function as protectants against biotic and xenobiotic toxic compounds. *Mol Gen Genom* **269**: 499-507.



*Un GRAZIE di cuore a chi mi è stato vicino.*

*Grazie alla mia grande famiglia, a cominciare da Alessandro,  
per tutto il bene che mi vogliono e per la pazienza che hanno nel sopportarmi.*

*Grazie al Professor Bagni, ad Annalisa, a Laura, a Marina,  
ai ragazzi e alle ragazze dei laboratori di Botanica.*

*Grazie alle persone degli altri laboratori che ho frequentato  
in questi anni fra Italia e Inghilterra.*

*Grazie alle amiche e agli amici di Bologna e di Norwich,  
italiani, inglesi e di tutto il mondo.*

*Grazie a tutte le altre persone che ho nel cuore...*

**GRAZIE!!!**